

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROTÜBÜL İNHİBİTÖRLERİNİN KANSER  
HÜCRELERİNDE TEHLİKE-İLİŞKİLİ MOLEKÜLER DESEN  
DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Uzm. Biol. Sakine ULUSOY**

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2020**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgisi, sonsuz sabrı ve motive edici danışmanlığıyla bana yol gösteren ve ışık tutan değerli danışmanım Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, teknisyenlere ve personellere destekleri ve iyi niyetlerinden dolayı teşekkür ederim.

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel katkıları, değerli dostlukları ve sonsuz desteklerinden dolayı Esendağlı Laboratuvarı'nın üyeleri Utku Horzum, Hamdullah Yanık, Ece Tavukçuoğlu, Sibel Gökşen, Gözde Bilir, Mubaida Parveen, Kerim Bora Yılmaz, Pınar Acar Özen, Anıl Işık, Ali Mert Sencer, Sefa Özdemir, Feyza Gül Özbay ve Alper Kurşunel'e teşekkür ederim. Ayrıca, lisans eğitiminden bu yana, bana olan inancını hiçbir zaman yitirmeyen, umutsuzluğa kapıldığım yerde tecrübesi ve bilgisi ile beni aydınlatan, başarabileceğim yönünde beni motive eden değerli hocam ve dostum Süleyman Can Öztürk'e sonsuz teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

Uzaktan da olsa manevi olarak her zaman yanımda olan, destekleri ile beni umutlandıran değerli dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma girdiği andan itibaren sonsuz inancı, desteği ve hiç bitmeyen cesaretlendirmeleri ile bana güç veren, her anımda yanımda olan ve sevgisini esirgemeyen Eren Karataş'a en büyük teşekkürü borçluyum.

Son olarak, koşulsuz sevgisi ile her zaman yanımda olan, manevi destekleri ile beni ayakta tutan, hayattaki en büyük moral kaynağım canım ailem Bektaş Ulusoy, Zeliha Ulusoy ve Kemal Ulusoy'a beni yetiştirirken yaptıkları fedakarlıklar ve bana olan güvenlerinden dolayı yürekten teşekkür ederim.

## ÖZET

**Ulusoy S. Mikrotübül inhibitörlerinin kanser hücrelerinde tehlike-ilişkili moleküler desen düzeylerine etkisinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Programı, Ankara, 2020.** Kanser hücreleri hızlı ve kontrolsüz çoğalan hücrelerdir. Vinorelbin ve kolşisin gibi kemoterapötikler hücre döngüsüne ve DNA sentez mekanizmasına etki eder; mikrotübüllerin polimerizasyonunu veya depolimerizasyonunu engelleyerek hücrelerin G2/M fazında tutulmasına neden olur. Vinorelbin mikrotübüllerin sonunda bulunan vinka bağlanma bölgesine bağlanarak mikrotübüllerin uzamasını engeller. Kolşisin ise çözünür formda bulunan tübülün dimerlerine bağlanarak tübülün-kolşisin kompleksi oluşturur. Bu tez çalışmasının hipotezi kapsamında hücre canlılığına zarar vermeyen konsantrasyonda uygulanan mikrotübül inhibitörleri nedeniyle G2/M fazında tutuklanan kontrol fibroblast ve kanser hücrelerinde immünolojik tehlike-ilişkili moleküler desen (*danger associated molecular pattern*, DAMP) moleküllerinin artış göstermesi incelenmiştir. Bu amaçla NIH/3T3, L929, 4T1, B16-F10 hücrelerinde, vinorelbin ve kolşisinin subtoksik konsantrasyonu belirlendi. Bu ajanların 10 saat ve 20 saat boyunca uygulanmasıyla G2/M oranında artış izlendi. Bu hücreleri senkron edebilmek amacıyla serum starvasyonu yapıldığında G0/G1 fazında tutulma görüldü. Senkron hale getirilmiş hücrelere vinorelbin ve kolşisin uygulandığında da 20 saat süren inkübasyonlarda G2/M oranında belirgin artış görüldü. Bu bulgular hücre iskeletindeki bozulma görüntülenerek doğrulandı. Hücre döngüsü blokajı altında gelişen hücresel stresin neden olduğu DAMP artışının belirlenmesi amacıyla 7 farklı DAMP geninin ifade düzeyindeki değişim incelendi. Vinorelbin ve kolşisin etkisi ile farklı koşullarda *Hmgb1*, *Nlrp3*, *Il33*, *Hsp70*, *Hsp90*, *Ppia* ve *H3.3* DAMP genlerinin mRNA düzeyinde artış belirlendi. Hücre dışına salınan DNA molekül artışı ve HMGB1 proteininin nükleusun dışına çıkışı ile de stres durumu doğrulandı. Sonuç olarak, vinorelbin ve kolşisin mikrotübül polimerizasyonunu bozarak hücre döngüsünün G2/M fazında tutulmasına neden oldu. Hücre döngüsündeki bu blokajın hücresel stres oluşturduğu ve DAMP ifadesinde artışa neden olabildiğine dair yeni bulgular elde edildi.

**Anahtar kelimeler:** Kolşisin, vinorelbin, tehlike-ilişkili moleküler desenler

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje No: TYL-2020-18737) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Ulusoy S. Investigation of the Effect of Microtubule Inhibitors on Danger-Associated Molecular Patterns (DAMP) Levels in Cancer Cells. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Master of Science Program, Ankara, 2020.** Cancer cells proliferate rapidly and uncontrolled. Chemotherapeutics such as vinorelbine and colchicine affect the cell cycle and DNA synthesis mechanism; they cause cells to be kept in the G2 / M phase by preventing the polymerization or depolymerization of microtubules. Vinorelbine binds to the vinca binding site at the end of the microtubules, preventing the elongation of microtubules. Colchicine forms a tubulin-colchicine complex by binding to tubulin dimers in soluble form. Within the scope of the hypothesis of this study, the increase of immunological danger-associated molecular pattern (DAMP) molecules in control fibroblasts and cancer cells arrested in the G2 / M phase due to microtubule inhibitors applied at a concentration that does not affect cell viability was investigated. For this purpose, the subtoxic concentration of vinorelbine and colchicine in NIH / 3T3, L929, 4T1, B16-F10 cells was determined. With the application of these agents for 10 hours and 20 hours, an increase in the G2 / M ratio was observed. When serum starvation was applied in order to synchronize these cells, G0 / G1 phase arrest was observed. When vinorelbine and colchicine were applied to synchronized cells, a significant increase in G2 / M ratio was observed in 20 hours of incubation. These findings were confirmed by imaging the disruption in the cytoskeleton. In order to determine the increase in DAMP caused by cellular stress developing under cell cycle blockage, the change in the expression levels of 7 different DAMP genes was examined. An increase in mRNA level of *Hmgb1*, *Nlrp3*, *Il33*, *Hsp70*, *Hsp90*, *Ppia* and *H3.3* DAMP genes was determined with the effect of vinorelbine and colchicine. The stress situation was also confirmed by the increase of DNA molecule released outside the cell and the translocation of the HMGB1 protein from nucleus to cytoplasm. Consequently, vinorelbine and colchicine disrupted microtubule polymerization, causing cell cycle arrest in G2 / M phase. There is new evidence that this blockade in the cell cycle creates cellular stress and can lead to an increase in DAMP expression.

**Key words:** Colchicine, vinorelbine, danger associated molecular patterns

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects

Coordination Unit (BAB, Grant Number, TYL-2020-18737).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜRLER	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1 Kemoterapötikler	3
2.1.1 Alkilleyici Ajanlar	4
2.1.2 Anti-Metabolitler	5
2.1.3 Topoizomeraz İnhibitörleri	5
2.1.4 Antibiyotikler	6
2.1.5 Mitoz inhibitörleri	6
2.2 İnflamasyon	12
2.2.1 Steril İnflamasyon	12
2.2.2 Tehlike Teorisi	13
2.3 Kanser ve Tehlike-ilişkili Moleküler Desen Molekülleri	20

<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	25
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	25
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	25
3.3. Hücre Kültürü	26
3.3.1 Hücrelerin Pasajlanması	27
3.3.2. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi	27
3.3.3 Hücre Sayımı	27
3.3.4. Serum Starvasyonu	29
3.4. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) Hücre Canlılık Analizi	29
3.5. In vitro Analizler İçin Oluşturulan Deney Tasarımı	30
3.6. Hücre Döngüsü Analizi	31
3.7. Moleküler Teknikler	32
3.7.1. RNA İzolasyonu	32
3.7.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	33
3.7.3. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)	33
3.7.4. Gerçek-zamanlı PZR	35
3.7.5. Agaroz jel elektroforezi	36
3.7.6. Süpernatandan DNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
3.8. İmmünfloresan Boyama	38
3.9. İstatistiksel Analiz	39
<b>4.BULGULAR</b>	40
4.1 Mikrotübül İnhibitörü Olarak Kullanılan Kolşisin ve Vinorelbinin Hücre Canlılığına Etkisi	40
4.2. Kolşisin ve Vinorelbinin Hücre Döngüsüne Etkisi	42
4.3. Kolşisin ve vinorelbinin DAMP genlerinin ifadesine etkisi	52

4.4 Vinorelbin ve Kolşisinin DAMP Düzeylerine Etkisi	59
<b>5.TARTIŞMA</b>	63
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	70
<b>7.KAYNAKLAR</b>	72
<b>8. EKLER</b>	
EK 1. Tez çalışması orijinallik raporu	
EK 2. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>5-FU</b>	5-florourasil
<b>ALL</b>	Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>ALR</b>	AIM2 benzeri reseptörler
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>CCF</b>	Kristalden Üretilmiş Kemotaktik Faktör
<b>DAMP</b>	Tehlike-İlişkili Moleküler Desen
<b>ERK</b>	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
<b>GDP</b>	Guanozin Difosfat
<b>GTP</b>	Guanozin Trifosfat
<b>HMGB1</b>	Yüksek Mobilite Grup Protein-1
<b>HSP</b>	Isı Şoku Proteini
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>LBP</b>	LPS Bağlayıcı Protein
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>MSU</b>	Monosodyum Üre Kristali
<b>MTOC</b>	Mikrotübül Düzenleme Merkezi
<b>MyD88</b>	Miyeloid Farklılaşma Primer Yanıt Proteini 88
<b>NF-κB</b>	Nükleer Faktör kappa B
<b>NK Hüresi</b>	Doğal Öldürücü Hücre
<b>NLRP3</b>	Nod Benzeri Reseptör Proteini 3
<b>PAMP</b>	Patojen İlişkili Moleküler Desen
<b>PGN</b>	Peptidoglikan



<b>PGP</b>	P-glikoprotein
<b>PPIA</b>	Peptidilprolil İzomeraz A
<b>PRR</b>	Desen Tanıma Reseptörü
<b>RIG-1</b>	Retinoik Aside Bağlı Gen 1
<b>TLR</b>	Toll-benzeri Reseptör
<b>TOP1</b>	Topoizomeraz 1
<b>TOP2</b>	Topoizomeraz 2
<b>TOPMT</b>	Mitokondriyal Topoizomeraz
<b>TS</b>	Timidilat Sentaz

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları. Kemoterapötik ajanların kanser hücresinde etki ettiği çeşitli mekanizmalar vardır (a) DNA'ya interkale olur ve topoizomeraz II aracılı DNA onarımını (doksorubisin) bozar; (b) mikrotübül polimerizasyonunu ve stabilizasyonunu destekler (paklitaksel ve dosetaksel); (c) DNA çapraz bağları (sisplatin, karboplatin) oluşturur; (d) timidilat sentaz (TS) (5-florourasil) inhibe eder; (e) pirimidin nükleosid antimetaboliti (gemsitabin) olarak hareket eder; (f) DNA'nın küçük oyuğuna (trabektedin) bağlanır. Genel olarak, hepsi DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu ve kanser hücresi ölümünü inhibe eder.	3
2.2. Mikrotübüller, hücre iskeletinin ana bileşenleridir. Mikrotübüller, doğrusal protofilamentlere bağlanmış alfa ve beta-tubulin alt birimlerinden oluşur. Tek bir mikrotübül, 24 nm genişliğinde içi boş bir silindir oluşturmak üzere birbirine dolanan 10 ila 15 protofilament (memeli hücrelerinde 13 tane) içerir. Mikrotübüller, içerdikleri tübülün molekülüne bağlı olarak, hızla büyüeyebilen (polimerizasyon ile) veya küçülen (depolimerizasyon ile) yapılardır.	7
2.3. Kolşisin, taksanlar ve vinka alkaloidlerin bağlanma bölgeleri.	8
2.4. Vinorelbinin kimyasal yapısı	10
2.5. Kolşisinin kimyasal yapısı	11
2.6. A) TLR4-MD2-LPS kompleksinin oluşumunun şekilsel gösterimi. LPS, MD2'ye aktarılır (i) LPS-MD2 kompleksi TLR4 ile birleşir (ii) daha sonra TLR4-MD2 dimerizasyonu olur ve TLR-MD2-LPS kompleksi oluşur (iii). B) Ligandın tanınması ve TLR4 kompleksinin birleştirilmesinin ardından ko-reseptörler TIRAP, MYD88, TRAM ve TRIF, antijene özgü immün yanıt ile sonuçlanan TLR4 sinyal yolağının aktivasyonu için hücre içi seviyede toplanır.	15
2.7. Histon yapısı ve nükleozom oluşumu. Bir nükleozom, histon moleküllerinin bir oktamerini içerir. Bir oktamer bir H3-H4 tetramer ve iki H2A-H2B dimeri içerir.	19

- 2.8.** DAMP'lar ve tümör ilerlemesine arasındaki ilişki. Ürik asit, HMGB1, S100 proteinleri, IL- $\alpha$  ve adenozin gibi DAMP'ların hücre salımı, farklı mekanizmalar ve hedef hücreler yoluyla tümör ilerlemesini destekleyebilir. Adenozin ve HMGB1, immün baskılamaya katkıda bulunabilir; HMGB1 ve IL- $\alpha$  anjiyogeneze; ürik asit, HMGB1, S100 proteinleri tümör hücresi proliferasyonuna katkıda bulunabilir. 22
- 3.1** Fuchs-Rosenthal hemositometrisinin (Hausser Scientific, ABD) mikroskop altında şematik görünümü. Bir kenarı 1 mm olan bir kare, kenarları 0,25 mm olan 16 küçük kare içerir. 28
- 3.2** Vinorelbin ve kolşisin ile muamele edilmiş NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16F10 hücreleri için kullanılan deney tasarımı. 30
- 3.3.** Hücre döngüsü analizlerinde kullanılan akım sitometri kapılama stratejisi. 31
- 3.4.** 50 bç DNA belirteci (GeneDireX, ABD). 37
- 4.1.** Kolşisin ve vinorelbin için toksik olmayan dozun belirlenmesi. A) Vinorelbin ve (B) kolşisin uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyon sonucunda elde edilen canlı hücre miktarları MTT yöntemi ile analiz edildi. C) Vinorelbinin (25 nM) 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele sonrasında 15 farklı hücre hattının canlı hücre miktarına etkisi. 40
- 4.2.** Vinorelbin ve kolşisin ile muamele edilen hücreler için deney tasarımı. 41
- 4.3.** Standart kültür ortamında tutulan ve serum starvasyonu yapılan hücrelerde 10 saat ve 20 saat 25nM vinorelbin ve kolşisin inkübasyonunun ardından yapılan MTT analizi sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, ve (D) B16-F10 hücreleri ile gerçekleştirilen canlılık analizlerine ait sonuçlar. 42
- 4.4.** NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinin akım sitometrik hücre döngüsü analizi sonuçları. A) Standart kültür ortamında inkübe edilen hücrelerin 0, 10 ve 20. Saatte hücre döngüsü analizi sonuçları. B) Hücrelerin başlangıçta (-24 sa) ve 24 saat standart kültür ortamında tutulduktan sonra (0 sa) ve 24 saat serum starvasyonu (0 SS) uygulandıktan sonra hücre döngüsü analizi sonuçları. C) Hücrelerin 24 saat serum starvasyonu ve starvasyonun ardından 10 saat ve 20 saat standart kültür ortamında inkübe edildikten sonra hücre döngüsü analizi sonuçları. 44

- 4.5.** NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinin kolşisin veya Vinorelbin uygulaması sonrasında hücre döngüsü analizi. A, C) hücrelerin standart kültür ortamında ve (B,D) serum starvasyonu sonrasında tam besiyeri içersinde eklenen (A,B) kolşisin ve (C,D) vinorelbin ile inkübe edildi. Hücre döngüsü fazlarındaki yüzde değişimi akım sitometri ile analiz edildi. 46
- 4.6.** NIH3T3, L929, B16F10 ve B16-F10 hücrelerinin 20 saat boyunca vinorelbin ve kolşisin uygulaması sonrası hücre döngüsü analizi. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücreleri standart kültür ortamında veya serum starvasyonu ardından 20 saat boyunca tam besiyeri içinde vinorelbin veya kolşisin ile inkübe edildi. Hücre döngüsü fazlarındaki yüzde değişimi akım sitometri ile analiz edildi. 48
- 4.7.** A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinin G2/M faz oranındaki değişim. Hücreler standart kültür ortamında veya serumsuz besiyerinde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra tam besiyeri içinde vinorelbin veya kolşisin ile 20 saate kadar inkübasyon devam ettirildi. 49
- 4.8.** Vinorelbin ve kolşisin etkisi altında hücrelerin mikrotübül ve aktin iskeletindeki değişimler temsili görüntüsü. A) L929, (B) B16-F10 hücreleri 20 saat 25nM Vinorelbine maruz bırakılmıştır. Ardından Mikrotübül ve aktin yapıları floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. 51
- 4.9.** *Hmgb1* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, (D) B16-F10 hücrelerinde *Hmgb1* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 52
- 4.10.** *Nlrp3* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *Nlrp3* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 53
- 4.11.** *IL33* genine ait qPCR sonuçları. (A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *IL33* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 54

- 4.12.** *Hsp70* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, (D) B16-F10 hücrelerinde *Hsp70* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 55
- 4.13.** *Hsp90* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, (D) B16-F10 hücrelerinde *Hsp90* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 56
- 4.14.** *Ppia* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *Ppia* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 57
- 4.15.** H3.3 (*H3f3a*) genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *H3f3a* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -actin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 58
- 4.16.** A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinden kolşisin ve vinorelbin etkisi ile hücre dışına salınan DNA miktarı. Qubit dsDNA BR Assay Kiti kullanılarak belirlendi. Sonuçlar hücre sayısına göre normalize edildi. 60
- 4.17.** A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinden serum starvasyonu sonrası vinorelbin ve kolşisin etkisi ile hücre dışına salınan DNA miktarı. Qubit dsDNA BR Assay Kiti kullanılarak belirlendi. Sonuçlar hücre sayısına göre normalize edildi. 61
- 4.18.** Hücrelerin HMGB1 sekresyonunun temsili görüntüsü. A) L929, (B) B16-F10 hücreleri 20 saat boyunca vinorelbin ve kolşisin ile inkübe edildikten sonra Hmgb1 antikoruna ile floresan boyaması yapıldı. 62

**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	PZR analizlerinde kullanılan primerlerin sekansları ve ilişkili bilgileri.	33
<b>3.2.</b>	Standart PZR bileşenleri.	34
<b>3.3.</b>	Gradyan PZR protokolü.	35
<b>3.4.</b>	Gerçek zamanlı PZR bileşenleri.	35
<b>3.5.</b>	Gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü.	36
<b>3.6.</b>	Qubit DNA konsantrasyonu sırasında kullanılan standart ve örneklerin hazırlanması.	38

## 1.GİRİŞ

Kanser hücreleri hızlı ve kontrolsüz çoğalan hücrelerdir. Kemoterapötik ilaçların çoğu, hücre bölünmesine veya DNA sentez mekanizmalarına etki eder (1). Kemoterapötik ilaçlar, alkilleyici ajanlar, antibiyotikler, anti-metabolitler, topoizomeraz inhibitörleri ve mitoz inhibitörleri olarak sınıflandırılabilir (2). Alkilleyici ajanlar DNA'nın guanin bazına alkil grubu ekleyerek çift sarmallı yapının bağlanmasını önler. Hücre döngüsünün herhangi bir fazında etki gösterirler (3). Anti metabolitler pürinleri taklit ederek DNA'ya zarar verirler ve hücrenin S fazına özgü ajanlardır. 5-florourasil, en bilinen anti-metabolitlerdendir ve DNA replikasyonunu bloke ederek hızlı çoğalan kanser hücrelerinin ölümüne ve büyümesinin yavaşlamasına neden olur (4). Topoizomeraz inhibitörleri ise DNA süpersarmalının açılmasını sağlayan topoizomerazlarla kompleks oluşturarak aktivitesini bloke eder. Hücre döngüsünün S-G2 geçişini hedefleyerek kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılır (1, 5). Mitoz inhibitörleri, genellikle miltorübülleri stabilize eden veya mikrotübül stabilitesini bozan ajanlar olarak sınıflandırılırlar (6). Mikrotübüller hücre iskeletinin ana bileşenlerindedir ve hücre şeklinin korunması, sinyal iletimi ve mitoz gibi önemli hücre işlevlerinde görev alırlar. Mikrotübüller  $\alpha$ -tübülün ve  $\beta$ -tübülünden oluşur. Flamentin iki ucuna sürekli tübülün dimerlerinin eklenip çıktığı dinamik bir yapıdır. Mikrotübüllerin inhibisyonu sinyal yollarının sürekli modifikasyonunu indükler ve apoptoza yol açar (7). Vinka alkaloidler mikrotübül polimerizasyonunu engelleyen ajanlardır. Tübülünlerin vinka bölgesine bağlanır ve tübülün dimerlerinin halka benzeri yapılarının düz protofilament yapı ile bağdaşmasını engeller (8, 9). Kolşisin çözünür halde bulunun tübülünlere bağlanarak tübülün-kolşisin kompleksini oluşturur ve mikrotübüllerin ucuna bağlanarak polimerizasyonunu engeller (10). Bu tez çalışması kapsamında hücre canlılığına zarar vermeyen konsantrasyonda uygulanan mikrotübül inhibitörleri nedeniyle G2/M fazında tutuklanan fibroblast ve kanser hücrelerinde immünolojik tehlike ilişkili moleküler desen (danger associated molecular pattern, DAMP) moleküllerinin artış göstermesi amaçlandı.

Bu çalışmada, bir vinka alkaloidi olan vinorelbin ve kolşisin kullanıldı. Bu ajanlar ile fibroblastlar ve kanser hücrelerinde hücre döngüsünün bloklanması amaçlandı. Nitekim kolşisin ve vinorelbin ile muamele edilen hücrelerde özellikle 20 saat süren inkübasyonların ardından G2/M oranında artış izlendi. Hücreleri senkron

edebilmek amacıyla serum starvasyonu uygulandığından tüm hücrelerde G0/G1 oranında artış belirlendi. Serum starvasyonu ardından kolşisin ve vinorelbin uygulanarak, bu ajanların senkron hale gelmiş hücelere etkisine bakıldı. Starvasyon sonrası hem kolşisin, hem de vinorelbin varlığında kanser hücelerinde G2/M oranında artış belirlendi. Fibroblast hücelerinde ise yalnızca vinorelbin varlığında G2/M oranında artış görüldü. Hücre iskeletindeki bozulma görüntülenerek de bu durum doğrulandı.

Mekanik travma, stres, ultraviyole, toksinler gibi çok sayıda steril uyarıcı, steril inflamasyon olarak adlandırılan patojen içermeyen inflamasyona sebep olurlar. Steril uyarıcılar, tehlike-ilişkilili moleküler desenler (*danger associated molecular pattern*, DAMP) olarak adlandırılan moleküllerin sentezlenmesine neden olurlar (11). Hücre döngüsü blokajı altında gelişen hücresel stresin neden olduğu DAMP artışının belirlenmesi amacıyla 7 farklı DAMP geninin ifade düzeyindeki değişim incelendi. *Hmgb1*, *Nlrp3*, *IL33*, *Hsp70*, *Hsp90*, *Ppia* ve *H3.3* mRNA düzeyindeki değişime bakıldığında, B16-F10 ve 4T1 hüceleri tüm damp genleri için çoğunlukla 10 saat inkübasyonu sonucu artış gösterirken, L929 hücelerinde *Ppia* ve *H3.3* mRNA düzeyinde kontrole göre değişim belirlenemedi. Aynı şekilde NIH/3T3 hücelerinde de *Hsp90* ve *H3.3* mRNA ifadesinde değişim izlenmedi. Hücre dışına salınan DNA moleköl artışı ve HMGB1 proteininin nükleusun dışına çıkışının gösterimi ile de stres durumu doğrulandı.

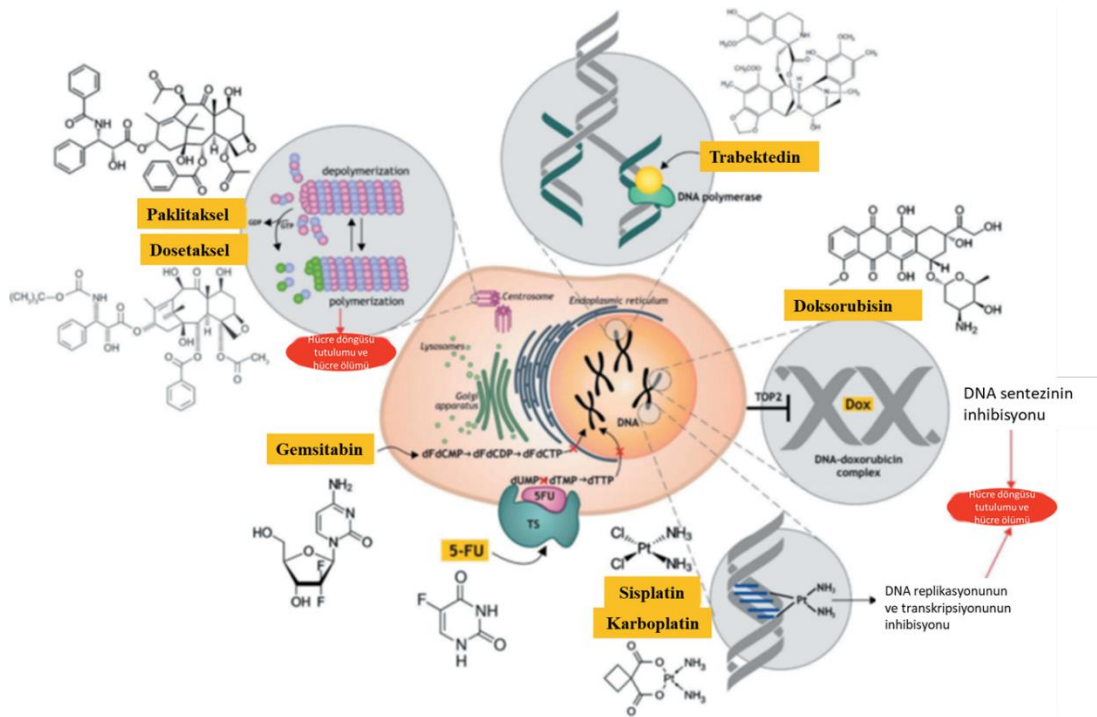
Sonuç olarak, vinorelbin ve kolşisin mikrotüböl polimerizasyonunu engelleyerek hücre döngüsünün bloklanmasına neden olur. Bu blokajın ardından hücresel stresin neden olduğu DAMP molekülleri artış yönünde düzenlenebileceğine yönelik bulgular elde edilmiştir. Hücre ölümünden veya hücre döngüsü blokajından dolayı artan DAMP'ların immün sistemi uyarabileceğine yönelik yeni hipotezler oluşturulabilmiştir.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kemoterapötikler

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların çoğu hücre bölünmesine ya da DNA sentez mekanizmasına etki ederek fonksiyon gösterir. Bu ajanlar hücre döngüsü fazlarından birine etki eder. Bu sebeple kemoterapötikler, hücre döngüsüne özgül veya hücre döngüsüne özgül olmayan olarak sınıflandırılabilir. Hücre döngüsüne özgül olan ajanlar döngünün bir fazını seçici olarak hedeflerken, diğerleri ise hücre döngüsünün herhangi bir fazında etki gösterebilir(1). Kemoterapötik ilaçlar alkilleyici ajanlar (örneğin; azot hardalları, oksazofosforin), antibiyotikler (örneğin; doktorubisin, daunorubisin, idarubisin, bleomisin), antimetabolitler (örneğin; metotreksat, 5-florourasil), topoizomeraz inhibitörleri (örneğin; kamptotesin, irinotekan, lamellarin D), mitoz inhibitörleri (örneğin; taksanlar, vinka alkaloidler, kolşisin) olarak sınıflandırılabilir (2).



**Şekil 2.1.** Kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları. Kemoterapötik ajanların kanser hücresinde etki ettiği çeşitli mekanizmalar vardır (a) DNA'ya interkale olur ve topoizomeraz II aracılı DNA onarımını (doktorubisin) bozar; (b) mikrotübül polimerizasyonunu ve stabilizasyonunu destekler (paklitaksel ve dosetaksel); (c) DNA çapraz bağları (sisplatin, karboplatin) oluşturur; (d) timidilat sentaz (TS) (5-florourasil) inhibe eder; (e) pirimidin nükleosid antimetaboliti (gemsitabin) olarak hareket eder; (f) DNA'nın

küçük oyuğuna (trabektedin) bağlanır. Genel olarak, hepsi DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu ve kanser hücresi ölümünü inhibe eder(12).

### 2.1.1 Alkilleyici Ajanlar

Alkilleyici ajanlar, 1949'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*U.S. Food and Drug Administration, FDA*) onayı alan en eski anti kanser ajanlardandır. Alkilleyici ajanlar Birinci Dünya Savaşı sırasında kimyasal silah olarak kullanılmıştır (3). Bu ajanlar, alkil karbon gruplarını çeşitli biyolojik moleküllere aktaran böylece yapılarını değiştiren ve fonksiyonunu bozan, çevrede ve canlı hücrelerde bol miktarda bulunan reaktif kimyasallar ailesidir (13). Azot 'hardalları' (*nitrogen 'mustards'*) gibi alkilleyici ajanların toksik, mutajenik, kanserojen ve teratojenik olabileceği belirtilmiş, fakat mekanizmaları aydınlatılmamıştır. (14). Dış (*external*) alkilleyici ajanların başlıca kaynakları arasında abiyotik bitki materyali gibi yan ürünler ve sigara dumanı, yakıt ürünleri, gıda bileşenleri gibi 'kirleticiler' bulunur. Oksidatif hasarın yan ürünleri olarak veya biyokimyasal reaksiyonlarda yaygın bir kofaktör olan S-adenozilmetiyonin gibi hücrel metil vericilerinden de iç (*internal*) alkilleyici ajanlar ortaya çıkabilir (13). Alkilasyon hasarının sebep olduğu sitotoksik, teratojenik ve kanserojen etkiler nedeniyle insan sağlığı için önemli tehditler oluşturmasına rağmen, bazı toksik alkilleyici ajanlar kanser hastalarında transforme hücreleri öldürmek amacıyla kemoterapötik ilaçlar olarak kullanılmaktadır (13).

En sık kullanılan alkilleyici ajanlar azot hardallarıdır. Bu kimyasal bileşiklerim pek çoğu sentezlenip kansere karşı test edilmiş olmasına rağmen, günümüzde sadece beşi kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar, mekloreタミン (orijinal azot hardalı), siklofosfamid, ifosfamid, melfalan ve klorambusildir. Azot hardallarının karakteristik kimyasal bileşenleri biskloroetil grubudur ve azot hardallarının tamamı aziridinyum arabileşeniyle reaksiyona girer. Bu bileşikler G-X-C/C-Y-G sekansındaki guanilat nükleotidlerinin N7 atomları arasındaki DNA bileşenlerini çapraz bağlar. Bu ajanların stabilitesini artırmak ve nitrojen hardallarının toksisitesini azaltmak için oksazofosforinlerden üretilmiştir. Siklofosfamid ve ifosfamid bu sınıfın başlıca türevleridir ve karaciğerde sitokromlar (P450) ile aktivasyon gerektiren pro-ilaçlardır (3). Siklofosfamid ve ifosfamid, sarkoma ve diğer solid tümörlerin tedavisinde

nörotoksisite, nefrotoksisite ve mesane toksisitesi gibi yan etkileri nedeniyle sıklıkla diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılır (3, 15).

### 2.1.2 Anti-Metabolitler

Antimetabolitler, birçok kanserin ve viral enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Antimetabolitler, hücre metabolizmasında rol oynayan doğal metabolitlerin analogları olarak tanımlanır; fakat, genel olarak RNA ve DNA'nın doğal yapı bloklarının analogları olan bileşiklere atıfta bulunulur (16). Bu ajanlar DNA replikasyonu ve hücre bölünmesine müdahale eden DNA veya RNA'ya dahil edilmesine izin veren pürinleri taklit ederek DNA'ya zarar verir. Alkilleyici ajanlar hücre döngüsünün tümünü etkilerken anti metabolitler hücre döngüsünün S fazını hedefler. Anti-metabolitler genellikle kronik ve akut lösemi vakaları gibi hematolojik malignitelerin tedavisinde kullanılır (1). Bu ilaçlar genellikle hidrofildir ve spesifik taşıyıcılar ile hücreye girerler (4). Metotreksat yapısal olarak folat ile ilişkili olan yaygın olarak kullanılan bir antimetabolittir ve DNA sentezi için gerekli olan dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder (1). Merkaptopurin ve 5-florourasil yaygın olarak kullanılan diğer antimetabolitlerdir (1, 16). Merkaptopurin hipoksantin analogudur ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavinde kullanılır. 5-FU, anti-kanser etkilerini timidilat sentazı (TS) inhibe ederek ve metabolitleri RNA ve DNA'ya dahil edilerek gerçekleştirir (17). 5-florourasil, DNA replikasyonunu bloke ederek hızla çoğalan kanser hücrelerinin ölümüne ve büyümesinin yavaşlatılmasına neden olur (1, 4). Sitarabin, kapesitabin, gempitabin ve desitabin primidin antagonistleri, fludarabin ve 6-merkaptopurin pürin antagonistleri olan alternatif antimetabolit kemoterapötik ilaçlardır (1, 16).

### 2.1.3 Topoizomeraz İnhibitörleri

DNA topoizomeraz I ve II (TOP1 ve TOP2) anti-kanser ilaçlar tarafından hedeflenebilen moleküller arasında yer alır. Memeli genomunda yedi topoizomeraz geni yer alır. Bunların dördü tip I topoizomerazları, üçü ise tip II topoizomerazları (TOP2 $\alpha$ , TOP2 $\beta$  ve SPO11) kodlar. Tip I topoizomeraz genleri, nükleer topoizomeraz I (TOP1), mitokondriyal topoizomeraz I (TOPMT), TOP3 $\alpha$  ve TOP3 $\beta$  'yı kodlar (5). Topoizomeraz, DNA onarımının gerçekleşebilmesi için DNA süpersarmalının açılmasını sağlayarak etki gösterir. Tip I topoizomeraz inhibitörleri, bu enzim ile

kompleks oluşturarak aktivitesini bloke eder (1, 5). Kamptotesin, irinotekan, topotekan ve lamellarin D Tip I inhibitörlerine örnektir. Tip II inhibitörleri ise, hücre döngüsünün S-G2 geçişini hedefler ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Amasakrin, etoposid ve teniposid Tip II inhibitörlerine örnektir (1).

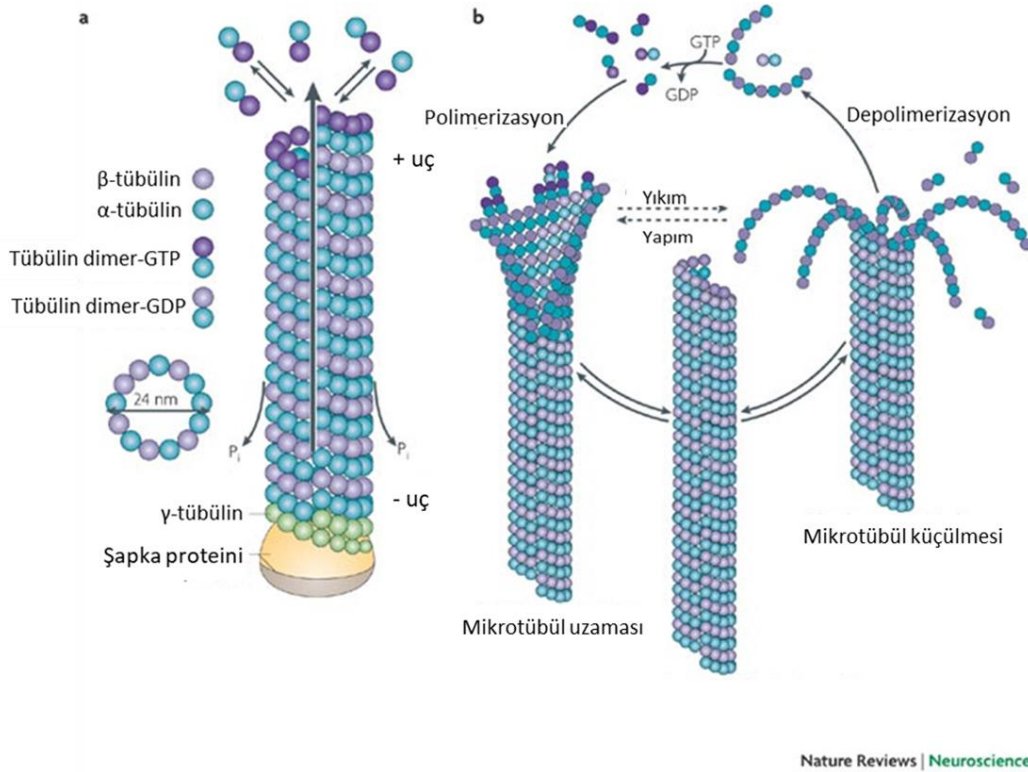
#### **2.1.4 Antibiyotikler**

Antitümör antibiyotikler genellikle mikroorganizmalardan türetilen ilaçlardır. Bu ajanlar hücre döngüsünün tüm aşamalarına etki ederler. Farklı kanser tiplerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (18, 19). Bu ajanlar özellikle yavaş büyüme hızına sahip tümörlerde etkilidir. En yaygın kullanılan anti-neoplastik antibiyotikler, meme kanserine, lösemiye, lenfomalara ve sarkomlara karşı aktivite gösteren antrasiklin ailesidir. Antrasiklin antibiyotikler topoizomerez II'yi inhibe eder ve aynı zamanda DNA'ya da interkale olur; hücre içindeki çeşitli moleküllerle etkileşime giren metabolitleri oluşturur. Daunorubisin, doksorubisin, idarubisin ve epirubisin antrasiklin antibiyotiklere örnek olarak verilebilir (18, 20). Bleomisin sitotoksik glikopeptid antibiyotiktir. DNA ipliklerinin kopmasına neden olur. Bleomisin, testis kanseri, lenfoma, baş boyun ve serviks kanseri dahil birçok kanser tedavisinde kullanılır (20).

#### **2.1.5 Mitoz inhibitörleri**

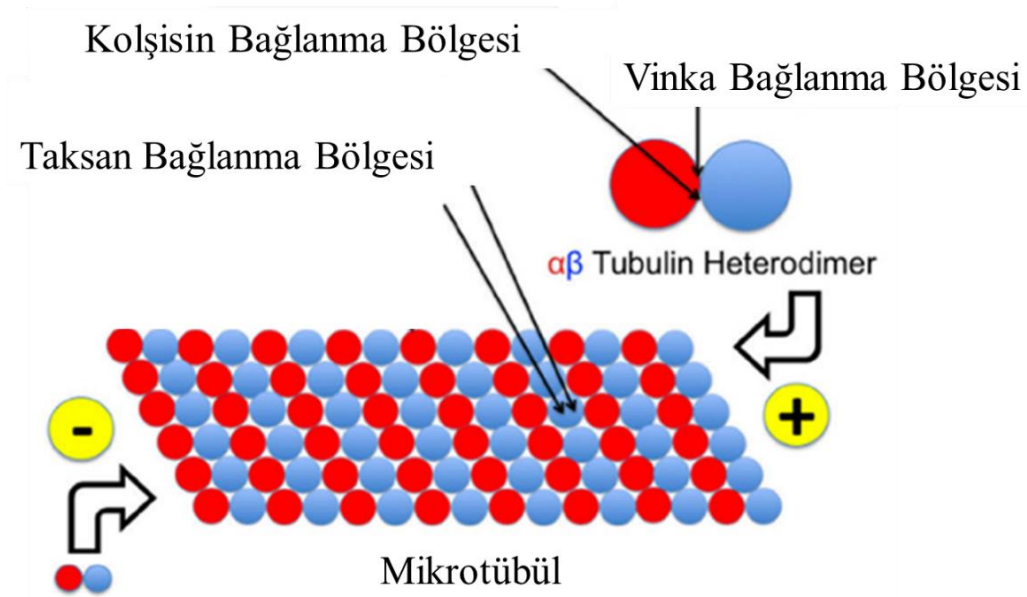
Günümüzde kullanılan kemoterapötik yaklaşımların birçoğu tümör hücrelerinin hiperproliferasyonunu engellemek ve sonrasında apoptozu indüklemek için hücre döngüsünü hedefleyen ajanları içerir. Mitoz inhibitörleri de mitotik işlev fonksiyonlarını inhibe eden ajanlardandır (6). Hücre iskeleti, tübülünler, ara filamentler ve mikrofilamentlerden oluşan bir lif ağıdır. Hücrenin şeklinin korunmasına ve veziküllerin, granüllerin, mitokondri gibi organellerin ve kromozomların özel bağlanma proteinleri aracılığıyla hareketlerine yardımcı olurlar. Bu sayede, hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde önemli rol oynarlar (20). Tübülünler, mikrotübüllerin alt birimleridir. Tübülün,  $\alpha$ -tübülün ve  $\beta$ -tübülün'den oluşur. Üçüncü bir tübülün türü ( $\gamma$ -tübülün) özgün olarak sentrozomda lokalizedir ve burada mikrotübül oluşumunun başlatılmasında kritik bir rol oynar. Tübülün dimerleri, genellikle içi boş bir çekirdek etrafına yerleşmiş 13 doğrusal protofilamentten oluşur ve mikrotübül oluşturmak için polimerize olurlar. Mikrotübüller dinamik yapılardır ve filamentin her iki ucuna

sürekli olarak tübülün dimerleri ekleyip çıkabilir. Her iki uçtaki değişim oranları dengeli değildir. Daha hızlı büyüyen uç artı uç olarak adlandırılırken, diğer uç eksi uç olarak bilinir (Şekil 2.2). Hücrelerde, mikrotübüllerin eksi uçları mikrotübül düzenleme merkezleri (*microtubule organizing centers*, MTOC) olarak adlandırılan yapılara tutturulur. Hücredeki birincil MTOC'ye sentrozom denir ve genellikle çekirdeğin yanında bulunur (6, 7). Mikrotübüller, hücre bölünmesi, hücre içi yapının organizasyonu, hücre hücre temasında fonksiyon gösterirler. Mikrotübül fonksiyonunun inhibisyonu, biyolojik süreçlerin ve sinyal yollarının sürekli modifikasyonunu indükler ve sonuçta programlanmış hücre ölümü süreci olan apoptoza yol açar (20). Mitoz inhibitörleri genellikle mikrotübülleri stabilize eden ajanlar ve mikrotübüllerin stabilitesini bozan ajanlar olarak iki gruba ayrılır. Çeşitli taksanlar (örneğin; paklitaksel, dosetaksel) mikrotübül stabilize ederken vinka alkaloidler (örneğin; vinorelbin, vinblastin, vinkrsitin) ve kolşisin stabilitesini bozar (6).



**Şekil 2.2.** Mikrotübüller, hücre iskeletinin ana bileşenleridir. Mikrotübüller, doğrusal protofilamentlere bağlanmış alfa ve beta-tubulin alt birimlerinden oluşur. Tek bir mikrotübül, 24 nm genişliğinde içi boş bir silindir oluşturmak üzere birbirine dolanan 10 ila 15 protofilament (memeli hücrelerinde 13 tane) içerir. Mikrotübüller, içerdikleri tübülün molekülüne bağlı olarak, hızla büyüeyebilen (polimerizasyon ile) veya küçülen (depolimerizasyon ile) yapılardır (21).

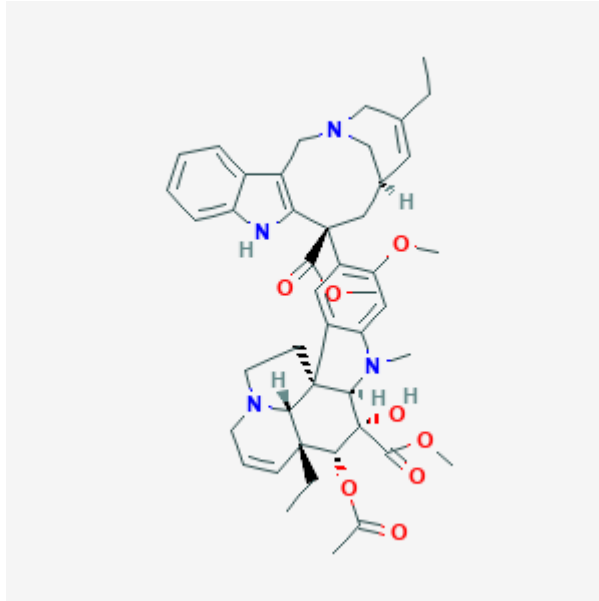
Taksanlar, kanser tedavisinde en etkili kemoterapötik ajanlar arasında yer alır (22). *Taxus brevifolia* bitki türlerinden izole edilen hidrofobik bileşiklerdir (20, 23). Taksanlar, mikrotübül depolimerizasyonunun inhibisyonuna neden olarak mikrotübüllerin normal foksiyonlarını bozarlar (20). Taksan bağlanma bölgesine (şekil 2.3) bağlanan ilaçlar arasında paklitaksel ve dosetaksel analogları en sık kullanılanlarıdır (6). Taksanlar mikrotübül lümeni içindeki özgün bağlanma bölgesine bağlanır ve değiştirilebilir GTP, kolşisin veya vinka alkaloidler ile rekabet etmez. Paklitaksel, mikrotübülleri polimerize etmek ve tübülünleri, GTP ve mikrotübül ilişkili proteinleri stabil tutmak için kullanılan bir ilaçtır (23). Paklitaksel B-tübüline bağlanır ve iki b-tübülün dimerini bir araya getirerek mikrotübülleri stabilize eder. Bu, birçok kromozomun mitototik iğde tutunmasını etkileyerek ciddi bozulmaya yol açar. Sonunda SAC (*spindle assembly checkpoint*) devreye girer ve mitozda hücreler tutularak hücre ölümüne yol açar (22, 24).



**Şekil 2.3.** Kolşisin, taksanlar ve vinka alkaloidlerin bağlanma bölgeleri (25).

Paklitakselin hücreye etkisi hetorejendir, hücre tipine ve konsantrayona bağlı olarak değişir. Hücre dışı düşük nanomolar konsantrasyonlarda, paklitaksel mikrotübülleri stabilize eder. Daha yüksek konsantrasyonlarda ( $\geq 1$  uM) ise polimer kütlesini önemli ölçüde artırır ve karakteristik mikrotübül demetlerinin oluşumuna neden olur. (23).

Vinka alkaloidler, mikrotübül polimerizasyonuna neden olan, mitozu inhibe eden ve apoptozu tetikleyen, stabilizasyonu bozan ajanlar olarak sınıflandırılırlar (26). Vinka bölgesi liganlarının mikrotübüllerin ucuna moleküler bir ‘kama’ gibi interkale olmasıyla mikrotübül stabilizasyonu bozulur. Tübülün mikrotübüllere düzgün bir şekilde eklenmesi için gerekli olan kavisli yapının geçişini önler ya da tübülün dimerlerinin halka benzeri yapılarının düz protofilament yapı ile bağdaşmasını engeller (8). Vinka alkaloidler, tübülün vinka bölgesini (şekil 3.2) hedefleyen en eski bileşik ailesini temsil eder (8). Vinblastin, vinkristin, vinorelbin ve vinflunin klinikte kullanılan vinka alkaloid ilaçlarıdır. Vinblastin ve vinkristin doğal kaynaklardan elde edilirken, vinorelbin ve vinflunin, vinblastinin yarı sentetik türevleridir (27). Vinorelbin (şekil 2.4), özellikle ileri meme kanseri ve ileri metastatik küçük hücreli-dışı akciğer kanserlerinde aktif olan geniş bir antitümör spektrumuna sahip yarı sentetik bir vinka alkaloididir. Vinkristin ve vinblastin ile karşılaştırıldığında, vinorelbin daha aktif ve nispeten daha az nörotoksiktir (28). Vinorelbin IC50 değerine yakın konsantrasyonlarda hücreleri G2/M fazında bloke eder, daha yüksek konsantrasyonlarda poliploidi oluşturur. Mikrotübüller vinorelbinin ana hedefidir. Vinorelbin, mikrotübüllerin pozitif ucuna yakın vinka bağlayıcı alanda B-tübülün alt-birimlerine bağlanır. Vinorelbinin hızlı ve geri dönüşümlü olarak tübülüne bağlanması, tübülün afinitesini artıran ve mikrotübül stabilizasyon kinetiklerinde önemli rol oynayan konformasyonel değişikliği tetikler (29). Vinorelbinin anti-tümör aktivitesinin tübülün ile etkileşerek mitozun inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (30). Ayrıca, amino asit, siklik AMP ve glutatyon metabolizması, kalmodulin bağımlı  $Ca^{++}$  taşıma ATPaz aktivitesi, hücre solunum ve nükleik asit biyosentezi gibi çeşitli olayları da etkileyebilir (29, 30). Vinorelbin, mikrotübül depolimerizasyonunu etkileyen konsantrasyon aralığında tübülün sentezinin azaltılmasına neden olur. Bu nedenle, mikrotübüllerin depolimerize edilmesinden ziyade mitotik iş dinamiklerini etkileyerek kemoterapötik etkilerini gösterir (29).



**Şekil 2.4.** Vinorelbinin kimyasal yapısı

Kolşisin bilinen en eski anti-proliferatif etkiye sahip alkaloidler arasında yer alır (31). Üç heksamerik halkadan oluşur (Şekil 2.5). C halkasının analogu olan tropolon metil ester, tübülün molekülüne bağlanarak mikrotübüllerin polimerizasyonunu engeller (32). Kolşisin anti-inflamatuvar, anti-mitotik ve anti-fibrotik aktiviteye sahiptir (33). Kolşisin psödogut, ailesel akdeniz ateşi, karaciğer ve safra sirozu ve amiloidoz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılır (33). Hürelere nüfuz eder ve hızlı bir şekilde dış ortamdaki konsantrasyonu ile dengelenir; ancak, doygunluğa ulaşılması için uzun bir süre gereklidir. Kolşisinin mikrotübüllere bağlanması ile mikrotübüller tübülün dimerlerine ayrılır. Kolşisin çözünür (*soluble*) tübülün için yüksek afiniteye sahiptir. Mikrotübül polimerizasyonunu bozabilmesi için bir tübülün-kolşisin kompleksinin mikrotübül ucuna bağlanması gereklidir. Mitozun farklı aşamalarındaki hücreler, kolşisine karşı farklı hassasiyet gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda, metafazdaki hücrelerin hücre döngüsü, kolşisin eklendikten hemen sonra bloke edilir. Düşük konsantrasyonlarda, profazdaki hücreler daha hassastır. Metafaz ve anafazdaki hücreler ise mitoz tamamlanırken bloke edilir (33).





**Şekil 2.5.** Kolşisinin kimyasal yapısı

Kolşisin, adanlık, ameboid hareket, lizozomların mobilizasyonu ve degranülasyonu gibi çeşitli lökosit fonksiyonları üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir. Bununla birlikte, kolşisinin en güçlü etkisi lökosit kemotaksisi üzerinedir (31). Kolşisinin nötrofil membranı üzerindeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azalttığı, migrasyonda ve endotelial hücrelerle etkileşmede önemli bir inhibisyona yol açtığı gösterilmiştir (31, 32). Kolşisin normal dokularda yüksek dozda ciddi toksisiteye neden olur; bu da kanser tedavisi amacıyla kullanımını sınırlar (33). Diğer taraftan, lökositlere verdiği hasar nedeniyle anti-inflamatuvar etki de gösterir (10). Kolşisin, nötrofil kemotaksisini ve monosodyum üre kristallerinin (MSU) fagositozundan sonra nötrofil lizozomlarından glikopeptid kristalinden türetilmiş kemotaktik faktörün (*crystal-derived chemotactic factor*, CCF) salınımını inhibe eder (10, 34). Yüksek konsantrasyonlarda kolşisin, kaspaz-1 aktivasyonundan ve ardından interlökin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve interlökin-18 (IL-18) işlenmesi ve salınımından sorumlu Nod benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3) inflamazom oluşumunu baskılar (10). Kolşisin gibi mikrotübül depolimerize eden ajanların kanser önleyici aktivite sağladığı ve özellikle Isı şok proteini 70 (*Heat shock protein 70*, HSP70), ısı şok proteini 90 (*Heat shock protein 90*, HSP90), *high mobility group box 1* (HMGB1) gibi tehlike-ilişkili moleküler desen (DAMP) düzeylerini artırabildiğine dair yayınlar mevcuttur (35).

## 2.2 İnflamasyon

İnflamasyon, patojenler, hasarlı hücreler, toksik bileşikler veya radyasyon mazuriyeti gibi zararlı uyarılara bağışıklık sisteminin verdiği yanıtır (36). Enfeksiyona yanıt olarak bir dizi sinyal, inflamatuvar hücrelerin, özellikle nötrofil ve makrofajlar gibi doğal bağışıklık hücrelerinin, toplanmasına yol açar. Bu hücreler sırayla inflamasyona neden olan ajanları fagosite eder. Çeşitli sitokin ve kemokinleri üreterek lenfositlerin aktivasyonuna ve edinsel bağışıklık tepkilerine yol açar (37).

İnflamatuvar yanıt, dokuya yerleşik hücrelerde ve kandan gelen lökositlerde immüneyi düzenleyen sinyal yollarının koordinatının bir şekilde uyarılmasıdır. İnflamasyon, kardiyokasküler hastalıklar, bağırsak hastalıkları, diyabet, artrit ve kanser gibi kronik hastalıkların patogenezinin altında yatar (36). İnflamatuvar yanıt süreçleri ortak bir işleyiş silsilesine sahiptir. Öncelikle hücre yüzeyindeki desen tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptors*, PRR) aracılığıyla zararlı uyarıları tanır ve inflamatuvar yollar aktive olur. İnflamatuvar sitokin ve kemokinler salınır ve lökositlerin bölgeye toplanması sağlanır (36, 37).

### 2.2.1 Steril İnflamasyon

Mekanik travma, iskemi, stres, ultraviyole, radyasyon, toksinler gibi çok sayıda steril uyarı, steril inflamasyon olarak adlandırılan patojen içermeyen inflamasyona sebep olur (11). Steril inflamasyonun tetikleyicileri, immun aktivasyon ile ilişkili olmalıdır. Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelerde proinflamatuvar bir tepki ortaya çıkarmalıdır (38). Hasara bağlı uyarılar, tehlike-ilişkili moleküler desenler (*danger associated molecular pattern*, DAMP) olarak adlandırılan moleküllerin sentezlenmesine neden olur (11). Steril inflamasyonun tetikleyicileri hücre içi ve hücre dışından köken alanlar olarak iki gruba ayrılabilirler. Hücre içi tetikleyiciler arasında HMGB1 (*High-mobility group box 1*) gibi nükleer proteinler, mitokondriyal DNA, peptitler, ürik asit ve ısı şok proteinleri (*heat shock protein*, HSP) gibi şaperonlar bulunur (38). DAMP'lar steril inflamatuvar reaksiyona yol açan doğal immüneye ilişkili reseptörleri aktive eder. Bunlar arasında Toll-benzeri reseptörler (*Toll like receptor*, TLR), NOD benzeri reseptörler, NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) inflamazom kompleksi içeren pirin bağlanma bölgesi

bulunur (11). İnflamazomlar, sensör proteini, apoptoz ilişkili *caspase-recruitment domain* (ASC) adoptör protein ve proinflamatuvar kaspaz içeren sitozolik molekül kompleksidir. İnflamazomlar, enfeksiyon veya hücrel stres ilişkili kaspaz-1'in aktivasyonu ile uyarıların algılanmasıyla tetiklenir (39). IL-1 ailesinin 11 üyesinden IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  steril hücre ölümüne karşı inflamatuvar tepkilere aracılık etmektedir. IL-1 $\beta$  ve IL-18 gibi bazı IL-1 ailesi sitokinleri inflamatuvar hücreler tarafından aktif bir şekilde salgılanır, inflamazomlar ve diğer reseptörler tarafından posttranslasyonel olarak düzenlenirler (40, 41).

### 2.2.2 Tehlike Teorisi

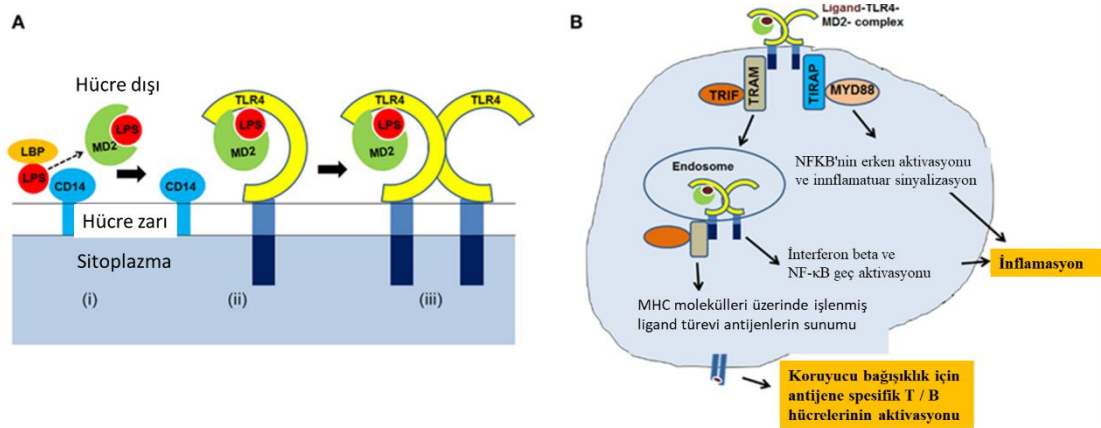
Tehlike teorisine göre, immün cevapların vücudun kendi hücreleri tarafından üretilen 'tehlike sinyalleri' veya 'alarm sinyalleri' tarafından tetiklenir. Tehlike teorisine göre her immün cevap öz olmayan (*nonself*, genetik olarak yabancı) sinyallerden değil, organizma içindeki 'tehlike sinyallerinin' algılanmasından kaynaklanır (42). Öz-olmayan teorisine göre, doğal bağışıklık tepkileri, konakçıdaki patolojik varlıklardan kaynaklanmaktadır. Antijen sunan hücrelerin yaygın doğal mikrobiyal desenlerle veya patojen ilişkili moleküler desenlerle (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP) etkileşime girecek şekilde evrimleştiği öne sürülmektedir. Antijen sunan hücreler evrim boyunca korunmuş yabancı molekül kalıplarını tanırlar. Matzinger'in tehlike teorisine gelene kadar bu yaklaşım doğrudur. Tehlike teorisi immün yanıtların öz-olmayan sinyallerle değil, hasarlı veya yaralı hücrelerden gelen endojen hücrel alarm sinyalleri tarafından tetiklendiğini iddia eder. Tehlike sinyalleri de PAMP'larla aynı şekilde naif T hücrelerin aktivasyonu ile sonuçlanan dendritik hücreleri aktive edebilir (42). Toll-benzeri reseptörler ve NOD-benzeri reseptörler, PAMP'ları algılayan ve akut inflamatuvar yanıtları uyaran desen tanıma reseptörleri olarak karakterize edilmiştir. *In vivo* koşullarda hücreler öldüğünde, nötrofiller ve monositler bölgeye toplanır ve bu olay patojenlerin yokluğunda steril koşullar altında da görülür (40).

Memelilerin doğal bağışıklık sisteminin en önemli görevleri arasında mikrobiyal enfeksiyonların saptanması ve koruyucu inflamatuvar yanıtların eşzamanlı uyarımı yer alır. Bakteriler, maya veya virüslerde bulunan ancak memeli hücrelerinde bulunmayan yüksek oranda korunmuş moleküller olan patojenle ilişkili

moleküler desenlerin (PAMP) saptanması bu inflamatuvar yanıtları tetikler (43). Charles Janeway 1989'da, bağışıklık sisteminin konağı zararsız yabancı antijenlere karşı değil, bulaşıcı patojenlere karşı korumak için evrimleştiğini öne sürmüştür. Antijen sunan hücrelerin üzerindeki reseptörlerin günümüzde PAMP olarak adlandırdığımız mikrobiyel antijenleri sinyal 0 olarak tanıdığını savunmuştur (44). PAMP'lar konakçı hücreyi kendinden olanı ve olmayanı ayırt etmeye ve doğal bağışıklık ile ilişkili sinyalleri algılamaya yönlendirir (45). Başlıca mikroorganizmalara özgül PAMP'lar, CpG DNA, çift sarmallı RNA, tek sarmallı RNA ve 5'-trifosfat RNA'lar gibi nükleik asitler, lipopolisakkaritler, yüzey glikoproteinleri ve peptidoglikanlar, lipoteikoik asit ve glikozilfosfatidilinositol gibi membran bileşenleridir (45). PAMP'lar, Toll benzeri reseptörler (TLR), Retinoik aside bağlı gen 1 (RIG-1) benzeri reseptörler (RLR), AIM2 benzeri reseptörler (ALR) ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi (NOD) benzeri reseptörler (NLR) gibi desen tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptor*, PRR) tarafından tanınırlar (45, 46).

Gram negatif bakteriler çok miktarda lipopolisakkarit (LPS) ve fosfolipid içeren bir dış membrana sahiptir. Bu moleküller çok sayıda protein ve nükleik asit bağlar (46). LPS, uzun yıllar önce gram negatif bakteriler tarafından oluşturulan sepsis patogenezinde kilit unsurlardan biri olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, septik şoktaki rolü tam olarak anlaşılammıştır (47). LPS ile indüklenen immün uyarımın etki mekanizması, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (*extracellular-signal-regulated kinase*, ERK) sinyal yolağının aktivasyonunun ardından gen aktivasyonu ile sona erer. LPS'e karşı inflamatuvar yanıt öncelikle MyD88 bağımlı ya da MyD88-bağımsız yollar aracılığıyla TLR4/MD2 kompleks sinyal iletimiyle düzenlenir (47). TLR4-MD2'nin dimerizasyonu, TIRAP (*Toll/ IL-1R domain containing adaptor protein*) ve MyD88'in hücre içi sinyal iletmesine, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açar. Ayrıca TLR4, TRIF ile ilişkili adaptör protein (TRAM) ve TRIF ile birlikte tip 1 interferonların üretimini uyarır (şekil 2.6) (48). LPS başlangıçta serum içindeki LPS bağlayıcı protein (*LPS binding protein*, LBP) ile birlikte bakteriyel zarlardan ve veziküllerden salınır. LBP daha sonra LPS'i çözünür formda bulunabilen ya da glikozilfosfatidilinositol ile hücre yüzeyine bağlanabilen CD14'e aktarır. CD14, LPS agregatlarını monomerik

moleküllere ayırır ve TLR4-MD2 kompleksine sunar. LPS, komplekse bağlandıktan sonra NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*) ve IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) dahil olmak üzere çoklu sinyal bileşenlerinin aktivasyonuna ve sonrasında proinflamatuar sitokinlerin üretilmesine yol açar (Şekil2.6) (48, 49).



**Şekil 2.6.** A) TLR4-MD2-LPS kompleksinin oluşumunun şekilsel gösterimi. LPS, MD2'ye aktarılır (i) LPS-MD2 kompleksi TLR4 ile birleşir (ii) daha sonra TLR4-MD2 dimerizasyonu olur ve TLR-MD2-LPS kompleksi oluşur (iii). B) Ligandın tanınması ve TLR4 kompleksinin birleştirilmesinin ardından ko-reseptörler TIRAP, MYD88, TRAM ve TRIF, antijene özgü immün yanıt ile sonuçlanan TLR4 sinyal yolağının aktivasyonu için hücre içi seviyede toplanır (48).

Peptidoglikan (PGN) neredeyse tüm bakterilerin hücre duvarının temel bileşenlerindedir. Ökaryotlarda bulunmaz; bu sebeple, doğal bağışıklık sistemi için iyi bir hedefdir. Memeliler de dahil olmak üzere yüksek ökaryotlar, CD14, TLR2, NOD1, NOD2 gibi birkaç PGN tanıma molekülüne sahiptir. Bu moleküller, mikroorganizmalara karşı konak tepkilerini uyarır veya doğrudan antimikrobiyal etkilere sahiptir (50). NOD reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimi MyD88'den bağımsız olarak ve MAP kinazlarının ve NF- $\kappa$ B'nin RIP2/(RICK) yolağıyla inflammatuar yanıt yaratır. Ayrıca, PGN, inflamazom birleşmesi ve kaspaz-1 aktivitesini uyarır (47). Peptidoglikanın kompleman ve monosit/makrofaj aktive etme yeteneği yıllar önce gösterilmiştir. Sepsis ve organ hasarına neden olan zararlı konakçı sitokin yanıtının başlatılmasındaki rolü gösterilmiştir (51).

Tehlike-ilişkili moleküler desenler (DAMP), hücrel stres veya doku hasarı durumlarında salınan moleküllerdir ve endojen tehlike sinyalleri olarak kabul edilirler (52). Doğal bağışıklık sistemini aktive ederek güçlü inflammatuar yanıtları uyarırlar (52, 53). DAMP'lar, doku hasarı veya hücre ölümünün ardından hücre dışı veya hücre

içi boşluklardan salınır, genellikle makrofajlar tarafından tanınarak TLR'ler ve inflamazomlar dahil olmak üzere farklı yollar üzerinden inflamasyon sürecini başlatırlar (52, 54). PAMP'lar gibi DAMP'lar da desen tanıma reseptörleri (PRR) tarafından algılanır (54). DAMP'lar kökenlerine veya kimyasal yapılarına göre sınıflandırılabilir. DAMP'ların moleküler yapısı küçük ürik asit veya adenosin trifosfat (*Adenosine triphosphate*, ATP) moleküllerinden 100 kDa'dan büyük proteinlere hatta organellere kadar oldukça heterojendir (54). Nekrotik hücrelerden salınan DAMP'lar arasında kromotinle ilişkili protein *high-mobility group box 1* (HMGB1), ısı şok proteinleri (*heat shock protein*, HSP) ve ATP gibi pürin metabolitleri bulunur (37). Hücre içi kaynaklardan gelen DAMP'lara ek olarak, hücre dışında bulunan DAMP'lar da mevcuttur. Bunlar, doku yaralanması sırasında hücre dışı matriks yıkımı ile sentezlenir. Hyalüronan, heperan sülfat ve biglikan gibi hücre dışı matriks parçaları, ölmekte olan hücrelerden salınan enzimler veya doku onarımını teşvik etmek için aktive edilen proteazlar tarafından protealiz sonucu oluşur. Hücre içi moleküllere ek olarak, IL-1a ve IL-33 gibi aktif proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin (örneğin, CXCL1) hücre içi depoları, nekrozu takiben açığa çıkabilir. Bu faktörler geleneksel DAMP'lardan kabul edilmemelerine rağmen, steril inflamatuvar yanıtlara aracılık edebilirler (37).

HMGB1, nükleozomlara bağlanan, DNA bükülmesini destekleyen bir şaperon olarak görev görür. Histon olmayan bir nükleer proteindir (11, 53, 55). HMGB'ler karboksi ucunda asidik kuyruğa sahip A-kutusu ve B-kutusu proteinlerinden oluşan oldukça korunmuş bir protein ailesidir. Bu proteinler, DNA'nın dizi özgünlüğü daha az olan küçük oyuğuna (*minor groove*) bağlanır ve birçok transkripsiyon olayını düzenler (56). HMGB1, steroid hormon reseptörleri, p53 ve NF-κB dahil olmak üzere, çeşitli proteinlerin transkripsiyonel aktivitesini etkiler. VD(J) rekombinasyonunu kolaylaştırır ve kromatin seviyesinde transkripsiyonel düzenlemeye katılır. HMGB1, sitoplazmada beclin1 ile etkileşime girerek otofajiye aracılık edebilir (57).

Pasif olarak salınan HMGB1'e yanıt vermenin yanı sıra, aktifle ve olmuş monositler ve makrofajlar HMGB1'i aktif olarak salgılayabilir. Bunu LPS, TNFα veya IL - 1β gibi çeşitli uyarılara yanıt olarak ve 9-16 saatlik bir gecikmeyle yaparlar. HMGB1'in salgılanması, nötrofillerin yanı sıra monositlerden birkaç sitokin salınımını tetikler. Bu şekilde, HMGB1 bir sitokin gibi davranır. HMGB1, HMGB1'in aktive

ettiği aynı hücrelerden salınımını uyarabildiği için inflamatuvar kaskadı koruyan bir pozitif - geri besleme otokrin döngüsü başlatabilir (58).

HMGB1, nekroz ile ölen hücrelerden serbest bırakılabilir (56). HMGB1'in apoptotik hücrelerden de salınabileceği gösterilmiştir (59). Apoptoz ve nekroz sırasında indirgenerek veya oksitlenerek farklı bir redoks duruma geçer (54). HMGB1'in asetillenmiş formu, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi uyarılmış doğal bağışıklık hücrelerinden aktif olarak salgılanabilir (56). TLR2, TLR4, TLR9, RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) (57) ve TLR5 (55) gibi çeşitli reseptörlere bağlanır. Kostimulatör moleküllerin ve MHC sınıf II ifadesini artırır. IL-12 ve IFN- $\gamma$  dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin varlığında T hücrelerini uyararak onları Th1 fenotipine polarize eder. Bu sayede olgunlaşmamış dendritik hücrelerin olgunlaşmasını uyarır (59). Nötrofillerin ve monositlerin HMGB1 ile uyarılması, sitokin salınımını başlatır. Bu hücrelerin vasküler endotele yapışmasını ve inflamatuvar dokuya göç etmesini sağlayan Mac-1 ve RAGE arasındaki etkileşimi artırır. HMGB1 inflamatuvar hücrelerin yapışmasını kolaylaştırmak için TNF- $\alpha$  ve monosit kemotaktik proteini (MCP)-1 ve ayrıca hücreler arası adezyon molekülü (ICAM)-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)-1 düzeyini artırarak vasküler endoteli hazırlar (59, 60). HMGB1 ayrıca LPS, DNA veya IL-1 $\beta$  gibi immün sistemi uyarabilen moleküllere bağlanabilir ve aktivitelerini sinerjistik bir şekilde ilerletebilir (61).

Isı şok proteinleri (*heat shock protein*, HSP), endojen tehlike sinyallerinin en kalabalık ailesidir. Farklı hücresel kompartmanlarda bulunan ve inflamasyon ile ilgili sayısız işlevi yerine getirebilen çok sayıda HSP vardır (56). HSP22 ve HSP70 sitoplazma ve çekirdekte bulunabilir. HSP60 ve HSP70 mitokondride bulunan HSP'lerdendir. gp96 ise endoplazmik retikulumda yerleşir (56). Doğru protein katlanmasını desteklemekteki rollerine ek olarak HSP'ler hücresel strese karşı doğal bağışıklık tepkilerinin önemli bir başlatıcısı olarak görev alır. Bu proteinler hasarlı hücrelerden salınır ve çeşitli TLR'lere bağlanarak doğal bağışıklık hücrelerini aktive eder (56). HSP'ler moleküler kütlelerine göre adlandırılırlar ve insan HSP'ler HSP110, HSP90, HSP70, HSP40 ve küçük HSP'lerden oluşur (62). Hücre-dışı HSP90 ve HSP70, edimsel bağışıklık sistemini aktive edebilir ve antijen sunumunun indüklenmesiyle özgün anti-tümör T hücre aracılı bağışıklığı ortaya çıkarabilir. TLR4,

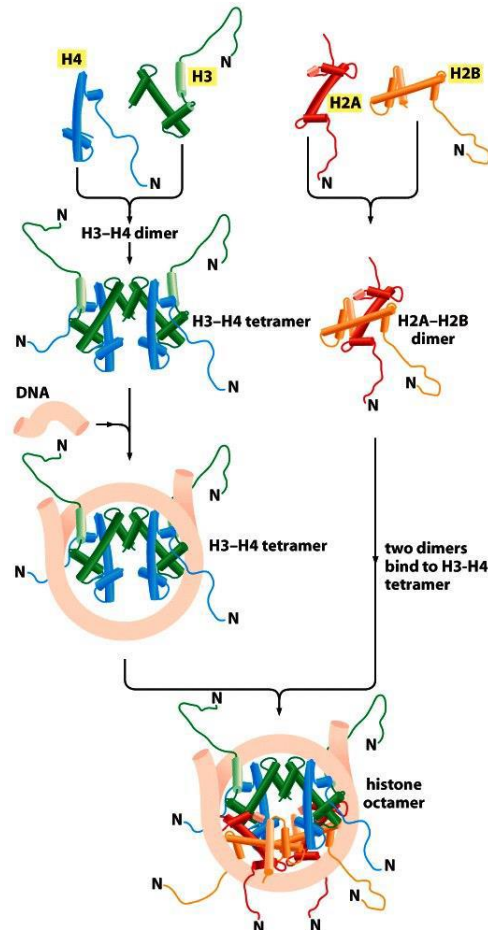
hücre içi antijen işleme ve sunumunu kolaylaştıran tümör hücreleri tarafından serbest bırakılan HSP'leri tanıyan esas reseptördür (62, 63) (Tablo 2.4). HSP70, tümör hücreleri nektotik ölüme maruz kaldığında, hücre zarı tehlikede olduğunda salınır (64). HSP70 ailesi üyeleri HSPA1A (HSP70-1) ve HSPA1B (HSP70-2), proteotoksik stres sensörü olarak işlev görür (65). Hücre dışı HSP70 aynı zamanda, hızlı kalsiyum akışını sağlar, NF- $\kappa$ B'yi aktive eder, TLR2 ve TLR4 yolları ile monositlerde ve dendritik hücrelerde inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini uyarır (66). Ayrıca, peptidlerle birleşerek ve CD91 ve LOX-1 gibi antijen sunan hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanabilir. Bu sayede HSP-peptid kompleksinin dendritik hücrelerce endositoz ile alınmasına ve böylece HSP'ye bağlı peptidin MHC-I ile çapraz sunumunun artmasına izin verir (67).

HSP70 doku hasarını önlemek için inflamatuvar yanıtı azaltabilir. Isı şokuna maruz kalan makrofajlar, HSP70'in en yüksek seviyeye ulaşması ile ilişkili olarak belirli zamanlarda TNF üretimini azaltır(66). HSP70'in aşırı düzeylerinin, insan makrofajlarında TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi LPS'in sebep olduğu sitokin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (68). HSP70 monositleri aktive edebilir ve hücre içi Ca<sup>2+</sup> akışı, NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokin (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) salınmasını uyarabilir (69). HSP27, HSP70, HSP90 gibi stres proteinleri, B hücreleri gibi ısı şokuna maruz kalan hücrelerden eksozom lümeni içine serbest bırakılabilir (64). Stres altındaki dendritik hücreler bağışıklık efektör hücrelerine HSP70'den türetilmiş peptitler sunar ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin ve sitotoksik T lenfositlerin aktivasyonuna sebep olabilir. Ayrıca, HSP60 inflamatuvar rekasiyonlar CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> düzenleyici T hücresini uyarır. HSP'ler özgül düzenleyici T hücreleri, IL-4, IL-10 salgılanması ve büyüme faktörü  $\beta$ 'nin dönüştürülmesi yoluyla proinflamatuvar efektör T hücrelerini doğrudan baskılar (70).

Histonlar, kromatin ve kromozom oluşumu sırasında çift sarmallı DNA'yı sararak oktamerler şeklinde kompleksleşen nükleer proteinlerdir. DNA'nın negatif yükünü nötralize eder (54, 71). Kromatinin önemli bir yapısal elemanı olan nükleozom, DNA'nın çekirdek histonlar (H2A, H2B, H3 ve H4) adı verilen histon proteinlerinin oktomer etrafına sarıldığı yapıdır (şekil 2.7). Nükleozomlar, bağlayıcı histonlar (H1 ve H5) ve histon-dışı proteinler yoluyla daha üst düzey yapılarda düzenlenir. Histonlar aynı zamanda epigenetik modifikasyonlarla gen ifadelerini



düzenler (71). Nükleer fonksiyonlarının yanı sıra, enfeksiyon, steril inflamasyon ve hücre ölümünden sonra histonlar salınabilir (62). TLR2, TLR4 ve TLR9, NLR'ler ve pirin-bölgesi içeren NALP3 inflamazomları hücre dışı histon aktivitesi için gereklidir (62, 72). Hücre dışı alanda histonlar, Toll-benzeri reseptörleri (TLR'ler) aktive ederek, proinflamatuvar sitokin yollarını uyarır ve fosfolipid membran geçirgenliğini değiştirerek sitotoksik DAMP proteinleri olarak işlev görür (73). Hücre dışı histon, reseptörüne bağlandıktan sonra MAPK, NF- $\kappa$ B ve MyD88 sinyal yollarını aktive edebilir (62, 74). Nekrotik hücrelerden salınan histonlar, NLRP3'e bağımlı bir şekilde makrofajlarda IL-1 $\beta$  üretimini uyarabilirler (71). Dolaşımdaki histon seviyelerindeki dinamik değişikliklerin yaşlanma ve kanser gibi hastalıklarda potansiyel biyobelirteçler ve yeni terapötik hedefler olabileceği öne sürülmektedir (62).



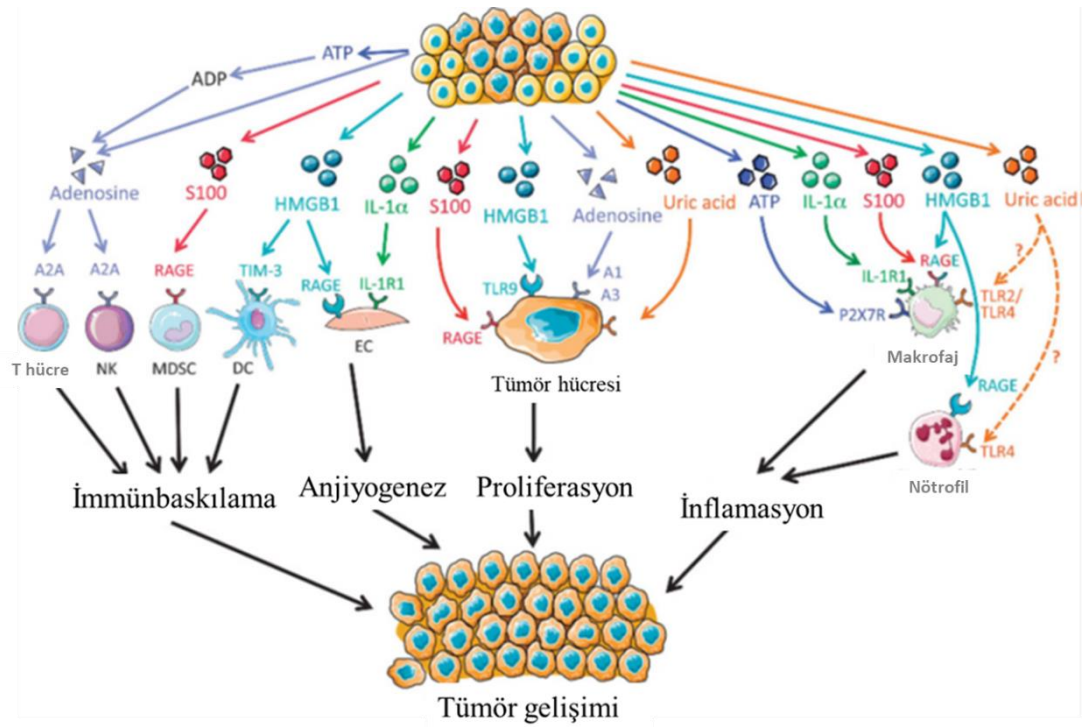
**Şekil 2.7.** Histon yapısı ve nükleozom oluşumu. Bir nükleozom, histon moleküllerinin bir oktamerini içerir. Bir oktamer bir H3-H4 tetramer ve iki H2A-H2B dimeri içerir (75).

Nükleik asitler genellikle hücre nekrozu ve nükleer yıkımdan sonra dolaşıma geçer. Hücre dışındaki bu DNA molekülleri DAMP görevi görebilir (76). Hücre hasarı sırasında nükleer ve mitokondriyal DNA'nın dolaşıma sızması bağışıklık istemini aktive edebilir ve çoklu organ disfonksiyonu, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıkların altında yatan inflamasyonu uyarabilir (77). Hücre hasarından kaynaklanan DNA, ligand olarak tanınacağı PRR'ye erişebiliyorsa, patojen organizmaların DNA aktivitesini taklit edebilir (71). TLR9'un patojen kaynaklı DNA'yı PAMP olarak tanınmasının yanısıra, konakçıya ait DNA'yı da DAMP olarak tanıyabilir. Mitokondriyal DNA da DAMP molekülü olarak işlev görür ve TLR9'a bağlı olarak p38 MAPK aktivasyonu yoluyla sistemik inflamatuvar yanıtları uyarır (78). TLR9'a ek olarak, inflamazom sensör proteinleri, immün yanıtları başlatmak için hücre içi DNA'yı tanır. DNA, *Pyrin and HIN domain-containing* (PYHIN-200) aile üyesi proteinleri AIM2 ve interferonla uyarılabilen protein 16 (*Interferon Gamma Inducible Protein 16*, IFI16)'yı aktive edebilir. AIM2 proteini, sitoplazmada bulunan çift sarmallı DNA'yı bağlar ve adaptör proteinin gelmesi ve kaspaz-1'in aktivasyonu ile inflamazom birleşmesini başlatır. IFI16, çift sarmallı DNA'yı bağlayabilir ve interferon genlerinin (STING; ERIS, MITA veya MPYS olarak da bilinir) aktivasyonu yoluyla sitokin üretimini destekleyebilir Endoplazmik retikulum yerleşik protein olan STING, AIM2 ve TLR'lerden bağımsız inflamatuvar sinyal yollarını uyarabilir. STING; IFI16, *DEAD box protein 41* ve siklik guanozin monofosfat-adenozin monofosfat sentaz (cGAS) gibi DNA sensörlerinin sinyallenmesi için yakınsama noktası olarak işlev görebilir (71). Ölmekte olan hücrelerden gelen genomik DNA, antijen sunan hücrelerin olgunlaşmasını uyarır. Antijene özgül antikor ve sitotoksik T hücre yanıtlarının gelişmesine etki eder (78).

### **2.3 Kanser ve Tehlike-ilişkili Moleküler Desen Molekülleri**

Kanser ve inflamasyon arasındaki bağlantı ilk olarak 19. yüzyılda, tümörlerin sıklıkla kronik inflamasyon bölgelerinde ortaya çıkması ve biyopsi metaryallerinde inflamatuvar hücrelerin gözlenmesiyle kuruldu. Kanser riskini artıran birçok kronik inflamasyon tetikleyicisi vardır. İnflamatuvar koşulların yönlendirdiği ya da inflamasyona ve neoplaziye neden olan genetik değişiklikler iki süreci bağlantılı hale getirmektedir (79). İleri evre katı tümörlerde DAMP seviyeleri fazla yükseldiğinden,

inflamasyon ile ilişkili DAMP'ların tümör biyolojisine etkisi söz konusudur (80). Endojen 'tehlike sinyallerinin' bağışıklık yanıtını tetiklemesi, kanser immünoterapi araştırmaları için önemli olmuştur (81). DAMP'lar nekrotik hücrelerden pasif salımla, apoptotik hücrelerden pulsatif salımla ve inflamasyon aracılı kaspaz-1 aktivasyonu ile aktifleştirilen lökositlerden uyarılmış salımla serbestlenir. Serbest bırakılan DAMP'lar TLR'ler ve farklı desen tanıma reseptörleri ile etkileşime girer. Bu süreçle TLR'ler tümör kaynaklı doku hasarını ve tümör biyolojisini inflamasyon ile birleştiren anahtar oyuncu olarak işlev görür (80). Dendritik hücrelerin tanıdığı desen tanıma reseptörleri, DAMP'lar için sensör görevi görür. Bu sayede dendritik hücreler ölmekte olan kanser hücrelerinin yakınına geçer ve antijen sunumunu iyileştirir. Bu nedenle, DAMP'lar immünojenik hücre ölümü olarak bilinen ölüm mekanizması yoluyla stresli ve canlılığını kaybeden kanser hücrelerine karşı immün yanıtları destekler (81). Artan stres faktörleri, özellikle oksidatif stres, DAMP'ların hücre dışı boşluğa geçişine ve burada birikmesine neden olur. Hücre içi DAMP'ların kaybı genomik dengesizliği, epigenetik bozulmayı, telomer yıpranmasını artırırken, artan hücre dışı DAMP'lar aşırı inflamasyon ve immün hasara neden olur. Bu DAMP aracılı patolojik değişiklikler kanser dahil birçok hastalığın tetiklenmesinde önemli bir etkindir (62). Kemoterapi, radyoterapi ve onkolitik virüsler gibi terapötik müdahaleler DAMP salımını tetikler (82). Çoğu tümörde sadece DAMP ifadesi ve karsinogenez arasında güçlü bir ilişki yoktur, aynı zamanda hem karsinogenezin erken evrelerinde hem de yerleşik tümörlerde inflamasyonu ve tümör gelişimini artırmak için çok sayıda DAMP bulunmaktadır. Artmış inflamasyon yoluyla tümör büyümesini teşvik etmenin yanı sıra, DAMP'ların tümör gelişimini ve ilerlemesini teşvik eden immünbaskılayıcı etkileri olduğuna dair kanıtlar da vardır (82).



**Şekil 2.8.** DAMP'lar ve tümör ilerlemesine arasındaki ilişki. Ürik asit, HMGB1, S100 proteinleri, IL-1 $\alpha$  ve adenosin gibi DAMP'ların hüresel salımı, farklı mekanizmalar ve hedef hücreler yoluyla tümör ilerlemesini destekleyebilir. Adenosin ve HMGB1, immün baskılamaya katkıda bulunabilir; HMGB1 ve IL-1 $\alpha$  anjiyogenez; ürik asit, HMGB1, S100 proteinleri tümör hücresi proliferasyonuna katkıda bulunabilir (82).

HMGB1, karaciğer sirozu, gastrik dispazi gibi prekanseröz durumlarda ve çok çeşitli tümörlerde yüksek düzeyde ifade edilir. Tümör gelişimini ve ilerlemesini destekleyen çeşitli inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir. Hücre dışı HMGB1 ve reseptörleri inflamatuvar mikroçevre, metabolik gereksinimler, invazyon ve metastaz, anti-tümör bağışıklık ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok mekanizma ile tümör gelişimini kolaylaştırır (62, 82).

HMGB1, TLR'ler aracılığıyla doğal bağışıklık sisteminin (nötrofiller, NK hücreleri, dendritik hücreler) aktivasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyarır. Ayrıca endotelial hücrelerin aktivasyonunu, anjiyogenez, kök hücre motilitesi ve proliferasyonunu indükleyerek NF- $\kappa$ B'yi aktive eder (83). Dendritik hücrelerde ifade edilen HMGB1 ve TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) arasındaki etkileşimler, ölmekte olan tümör hücrelerinden salınan nükleik asitlerin immünojekliliğini azaltarak terapötik etkinliğin baskılanmasına neden olur. Bu nedenle, HMGB1 sadece inflamatuvar yolların

aktivasyonu ile değil, aynı zamanda immün baskılama ile de karsinogenezi teşvik edebilir (82).

ATP erken apoptotik aşamada ölmekte olan tümör hücrelerinden aktif olarak salınır ve tümör biyolojisini düzenler. Hücre dışı ATP, dendritik hücrelerin ve ayrıca kanser hücrelerinin hücre göçünün düzenlenmesinde rol oynar. Böylece, kanser hücrelerinin hücre göçünü uyararak invazyonu ve metastazı etkileyebilir. Antikanser tedavisi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Hücre dışı ATP hücre proliferasyonunu uyarabilir ve adenozin gibi immünbaskılayıcı ajanların kaynağı olabilir (84). ATP, iyonotropik P2X reseptörlerine (P2XR) bağlanır ve sodyum ( $\text{Na}^+$ ) ve kalsiyum ( $\text{Ca}^{2+}$ ) içeri akışına ve potasyum ( $\text{K}^+$ ) dışarı akışına izin verir. Artan hücre içi kalsiyum seviyesi p38 MAPK veya fosfolipaz A2 sinyal yolağına aktive ederken, potasyumun dışarı akışı inflamazomları aktive eder (53).

Adenozin, çeşitli hücre tiplerine etki eden ve yaralanma sonrası inflamatuvar yanıtı sınırlamaya katkıda bulunan güçlü bir anti-inflamatuvar DAMP molekülüdür. Tümör mikroçevresindeki adenozin düzeylerindeki artış, T hücrelerinin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin baskılanması yoluyla tümör ilerlemesine katkıda bulunur. A2A reseptörünün uyarılması, NK hücrelerinin olgunlaşmasını ve sitotoksik fonksiyonunu azaltır, bu da metastazın gelişmesine yol açar. Ayrıca düzenleyici T (Treg) hücreleri, çeşitli tümörlerde ektonükleotidaz CD39 ve CD73'ü eksprese eder, bu da periküler adenosin üretimi ve A2A reseptörü aracılı efektör T hücrelerinin inhibisyonu ile sonuçlanır (82, 85).

Ölmekte olan hücreler hücre içi ürik asit depolarını serbest bırakırlar ve nükleik asitlerin enzimatik bozulması sırasında ek ürik asit üretilir. Hücre dışı ürik asit, TLR4 aracılı NLRP3 inflamazom aktivasyonu yoluyla, nötrofil aktivasyonunun yanı sıra dendritik hücre olgunlaşması ve T hücresi farklılaşmasına aracılık ederek inflamatuvar yanıtları uyarır. Kanser hücrelerinin kendileri göç aktivitesini artırarak ürik aside yanıt verirler. Buna göre, hastalarda ürik asit seviyelerinin yükselmesi aşırı kanser riski ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, kemoterapiye veya bağışıklık reddine maruz kalan tümörlerden salınan ürik asit, tümör gerilemesini hızlandırır (82).

IL-1 $\alpha$ , aktivasyon veya nekrozun ardından birçok hücre tipi tarafından salınır ve IL-1 sinyal iletimi, nekrotik hücre ölümüne yanıt olarak belirtilir. IL-1 $\alpha$ 'nın öncü

formu yukarı regüle edilir ve daha sonra hipoksiyi takiben ölmekte olan hücrelerden salınır (82). Nekrotik hepatositler tarafından salınan IL-1 $\alpha$ , dengeleyici çoğalmaya ve karsinogeneze katkıda bulunur. Salgılanan IL-1 $\alpha$  formu, tümör mikro-ortamında yüksek derecede proinflamatuvar olmasına rağmen membran formu anti-tümör bağışıklığı desteklemekte ve tümör büyümesinin ve invazyonun azalmasına yol açmaktadır (86).

Kalsiyum bağlayıcı sitozolik protein ailesi olan S100 proteinleri, kalsiyum dengesini, hücre apoptozunu, göçünü, çoğalmasını, farklılaşmasını, enerji metabolizmasını ve inflamasyonu düzenleyerek çok çeşitli hücre içi ve hücre dışı işlevlere sahiptir. S100 proteinleri doku / hücre hasarı ve hücrel stresin etkisiyle sitoplazmadan salınabilir. Hücre dışı S100 proteinleri tehlike sinyalleri TLR'ler ve RAGE gibi desen tanıma reseptörlerine bağlanarak bağışıklık hücrelerini ve endotel hücrelerini aktive eder (87). Tehlike sinyali olarak işlev gören hücre dışı S100 proteinleri; homeostazi, travma sonrası yaralanmayı ve inflamasyonu düzenlemek için çok önemlidir. S100A8 ve S100A9 ağırlıklı olarak monositler, nötrofiller ve dendritik hücrelerde eksprese edilir. Bununla birlikte, aktivasyon ile fibroblastlar, olgun makrofajlar, vasküler endotelial hücreler ve keratinositler gibi hücre tiplerinde de eksprese edilirler. Nötrofillerde, sitozolik proteinlerin % 45'i S100A8 ve S100A9 ile oluşturulurken, oran monositlerde sadece% 1'dir (88).

HSP70-1'in aşırı düzeyde ifadesinin, fare fibrosarkom hücrelerinde tümör oluşumuna yardımcı olduğu ve bu hücreleri sitotoksik T hücreleri ve makrofajlar tarafından öldürülmeye dirençli kıldığı gösterilmiştir (89). Transgenik farelerin T hücrelerinde HSP70-1'in varlığı T hücre lenfoma oranında artışa neden olmuştur (90). Yakın zamanda, Her2/neu resptörünün aracılık ettiği transformasyon için HSP70-1'in gerekli olduğu kaydedilmiş ve meme kanseri hücre hatlarında HSP70-2'nin aşırı ekspresyonu görülmüştür. Bu bilgiler, HSP70'in onkogen olarak işlev yapabileceğini göstermektedir (90). Bazı kanıtlar insan kanserlerinde HSP70-2'yi gösterse HSP70'in baskın formu sitozolik, HSP70-1'dir. HSP70'in kanserde aşırı ifade edildiğine ve bu şaperonun yüksek düzeylerinin ileri evre kanserler ve kötü prognoz ile de ilişkili olduğuna dair bulgular vardır (90).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda Haziran 2019 – Ağustos 2020 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi tozu (*phosphate buffered saline*, PBS) (Advansta, ABD); *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), RPMI 1640, penisilin/streptomisin çözeltisi, L-glutamin, 10x Tripsin/EDTA, fetal buzağı serumu (*fetal bovine serum*, FBS) (Biological Industries, ABD); tripan mavisi,  $\beta$ -merkaptotanol, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, etanol, dietilpirokarbonat (*diethylpyrocarbonate*, DEPC), sodyum dodesil sülfat (SDS), N,N-dimetilformamid (DMF), etidyum bromür, 6x yükleme boyası (*loading dye*), ribonükleaz A, propidyum iyodür (Sigma-Aldrich, ABD); anti fare HMGB1 monoklonal primer antikör (Abcam, ABD); dimetil sülfoksit (DMSO), 10x tris-borat-EDTA (TBE) tampon çözeltisi, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), Taq polimeraz enzimi, 25 mM dNTP çözeltisi, (Thermo Fisher Scientific, ABD); 96 kuyucuklu plaka, 6 kuyucuklu plaka, T25 ve T75 flask, serolojik pipetler, tüpler (15 mL, 50 mL) ve diğer plastik laboratuvar gereçleri ( Nest, Çin; Orange Scientific, Belçika; Sarstedt, Almanya); agaroz (Lonza, ABD); oligo(dT) primerler, 2x reaksiyon tamponu, 10x ters (*reverse*) transkriptaz (RT) enzimi (New England BioLabs, ABD); 50 bazçifti (bç) DNA belirteci (GeneDireX, ABD); Anti-tavşan Alexafluor-555 işaretli sekonder antikör, alexafluor-555 işaretli falloidin, kapatma çözeltisi (Abcam, Birleşik Krallık); Paklitaksel Oregon green 488 konjuge (Invitrogen, ABD); kolşisin (Sigma, Hindistan); Vinorelbin (*Vinorelbine bitartrate*) (Toronto Research Chemicals, Kanada).

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

**PBS Tampon Çözeltisi:** PBS tampon çözeltisi 1x hazırlamak için ticari olarak alınmış PBS tozu 500 mL distile suda (dH<sub>2</sub>O) çözüldü ve otoklavlanarak steril hale getirildi. Hazırlanan 1x PBS 4°C'de muhafaza edildi.

**Tam RPMI 1640 Besiyeri:** Ticari olarak temin edilen RPMI 1640 kültür ortamına ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin eklenerek hazırlandı. Tam besiyeri 4°C’de saklandı.

**Tam DMEM Besiyeri:** Ticari olarak temin edilen yüksek glikoz (4,5 g/L) içeren DMEM kültür ortamına ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin eklenerek hazırlandı. Tam besiyeri 4°C’de saklandı.

**Tripan Mavisi:** Toz halde bulunan tripan mavisi 1x PBS ile çözülerek %0,4 derişime sahip tripan mavisi çözeltisi elde edildi. Hazırlanan çözelti 0,22 µm por çapına sahip steril filtreden geçirilerek alikotlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

**Propidyum iyodür (PI):** Propidyum iyodür tuzu (5 mg) 1mL distile suda çözülerek PI çözeltisi hazırlandı ve filtreden geçirilerek 4°C’de muhafaza edildi.

**3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT):** MTT tozundan 5 mg tartılarak 1 mL PBS ile çözüldü ve 4°C’de saklandı.

**SDS/DMF çözeltisi:** SDS/DMF çözeltisini hazırlamak için, 25 mL DMF, 25 mL distile suyka karıştırıldı ve 10 gr SDS yavaşça eklendi. Ardından hidroklorik asit ve sodyum hidroksit ile pH 4,7’ye ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

### 3.3. Hücre Kültürü

Bu çalışmada fare embriyonik fibrblast hücre hattı NIH/3T3, L929 sarkoma, fare meme kanseri hücre hattı 4T1, fare melanom hücre hattı B16-F10, insan adenokarsinom hücre hattı NCI-H441, insan sarcoma hücre hattı SW982, fare meme tümörü EMT6/AR1, insan duktal adenokarsinom hücre hattı CFPAC-1, insan beyin-kan-bariyeri hücre hattı hCMEC-D3, fare meme kanseri hücre hattı 4T1-Red-Fluc, insan karsinoma hücre hattı A549, insan glioblastom hücre hattı U-87 MG ve U-87-MG-Red-Fluc hücre hatları, insan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı NCI-H1299 kullanılmıştır. Tüm hücre hatları aderan olarak büyümektedir. NIH/3T3, L929, B16-F10, MDA-MB-231, U-87 MG, U-87 MG-Ref-Fluc, ve A549 hücre hatları için tam DMEM besiyeri kullanılırken, 4T1, 4T1-Red-Fluc, NCI-H441, CFPAC-1, EMT6/AR1, SW982 ve NCI-H1299 hücre hattı



için tam RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren yüksek nemli 37°C'deki inkübatörde muhafaza edildi.

### 3.3.1 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması için yoğunluğunun yaklaşık %80 olmalarına dikkat edildi. Pasajlanacak olan aderan hücrelerin büyüme ortamı flasktan uzaklaştırılarak 1x PBS çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra, 10x konsantrasyonda Tripsin/EDTA çözeltisi (T25 flasklara 300 µL, T75 flasklara 600 µL) eklendi ve inkübatörde 3-4 dakika tutuldu. Hücreler mikroskop altında gözlenerek kültür kabının tabanından ayrılır ayrılmaz, her hücre için uygun besiyeri eklenerek tripsinizasyon sonlandırıldı. Hücre çoğalmasının devamlılığı için NIH/3T3 ve L929 hücreleri 1:8; 4T1 ve B16F10 hücreleri 1:10 oranında seyreltilerek pasajlandı.

### 3.3.2. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi

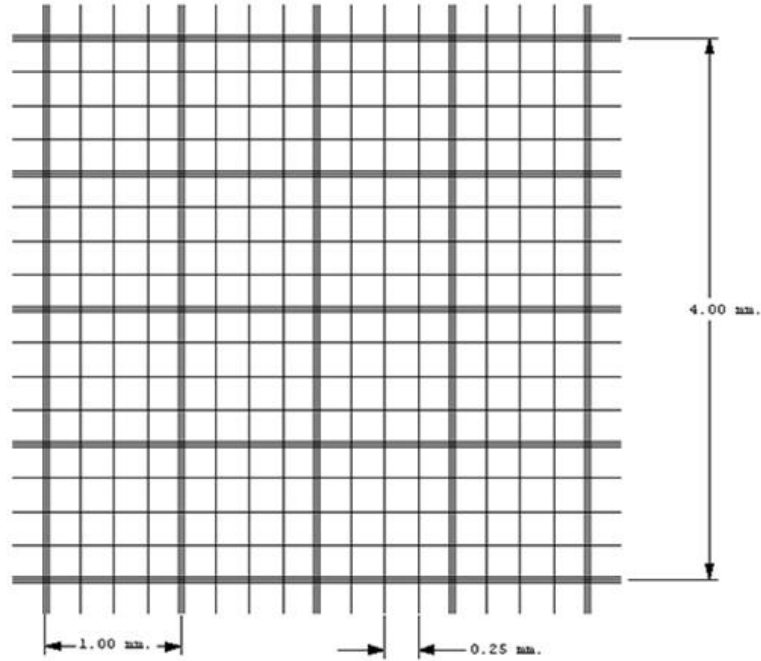
Dondurulması planlanan hücreler, tam besiyeri ortamı (%50), FBS (%40) ve DMSO (%10) içeren bir çözelti içerisinde süspanse hale getirildi. Hücreler hızlı bir şekilde kryoviallere aktarılarak alikotlandı. Vialler '*Mr. Frosty*' dondurma kabına (Thermo Fisher Scientific, ABD) koyularak bir gece -80°C'de saklandı. Daha sonra, -195°C sıvı azot içeren tankın buhar fazına yerleştirildi.

Hücrelerin çözülmesi için sıvı azotun buhar fazında bulunan çekmecelerden alınan vialler daha önce 37°C su banyosunda ısıtılmış distile su içeren behere hızlıca transfer edildi. Daha sonra, etil alkol ile sterilize edilerek laminer akım kabine alındı. Vialler içinde buluna hücre süspanسیونu önceden 37°C'ye getirilmiş tam besiyeri içeren 50 mL'lik tüplere Pastör pipeti ile aktarıldı. DMSO içeren ortamı uzaklaştırmak için santrifüj edildi (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı). Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılarak hücreler tam besiyerinde yeniden süspanse hale getirildi. T25 flasklara alınarak inkübatöre kaldırıldı.

### 3.3.3 Hücre Sayımı

Hücreleri doğru bir şekilde sayabilmek için hücre süspanسیونu homojen ve tek hücrelerden oluşmalıdır. Tripsin-EDTA prosedürüne (bkz. 3.3.2) göre süspanse hale getirilen hücreler nazikçe pipetlenerek küme oluşumundan kaçınıldı. Hücre

süspansiyonundan alınan 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  %0,4 tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılarak (seyreltme faktörü=2) Fuchs-Rosental hemositometrisinde lam ile lamel arasına kapiler akış ile aktarıldı. Işık mikroskopunda 10x büyütme ile sayım yapıldı. Mikroskop altında 16 küçük kareden oluşan alandan her sütun ve satırdan birer tane olacak şekilde 4 küçük karede boyayı içine almamış canlı hücreler sayıldı (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1** Fuchs-Rosental hemositometrisinin (Hausser Scientific, ABD) mikroskop altında şematik görünümü. Bir kenarı 1 mm olan bir kare, kenarları 0,25 mm olan 16 küçük kare içerir.

Fuchs-Rosental hemositometresinin sayım yapılan büyük karenin alan ölçüleri 1 mm x 1 mm'dir ve lam ile lamel arasındaki mesafe 0.1 mm'dir. Bu değerler dikkate alındığında hücre sayısı aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Alan} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$$

$$\text{Hacim} = 1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4}$$

$$\text{Hücre Sayısı/mL} = \frac{\text{Toplam Sayılan Hücre}}{\text{Sayılan Alan}} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10000 \quad (3.1)$$

### 3.3.4. Serum Starvasyonu

Hücre döngüsü senkron hale getirilebilmek için hücelere serum starvasyonu yapıldı. Bunun için hücreler 6 kuyucuklu tabakalara ekildi. Bir gece boyunca beklenip hücreler tabana tutunduğunda hücre ortamı 1,5 mL serum içermeyen besiyeri ile değiştirildi ve hücreler serumsuz ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi.

### 3.4. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) Hücre Canlılık Analizi

İlk etapta, NIH/3T3 hücreleri kuyu başına  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 100  $\mu$ L tam DMEM içinde 96 kuyucuklu plakaya ekildi. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendi. Daha sonra, farklı konsantrasyonlarda (0, 6,25, 12, 25, 50, 100, 200, 400, 800 nM) vinorelbin ve kolşisin tam besiyeri içinde triplike kuyulara eklendi. İnkübasyonun (24, 48 ve 72 saat) ardından her bir kuyuya 5 mg/mL MTT 25  $\mu$ L içinde eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Ardından 80  $\mu$ L SDS/DMF çözeltisi her bir kuyuya eklendi. Boş bir kuyuya da kör (*blank*) olarak SDS/DMF eklendi. 96 kuyucuklu plakalar yaklaşık 16 saat inkübe edildikten sonra, her bir kuyunun absorbansı mikropilaka spektrofotometresinde (Spectra Max Molecular Devices, ABD) 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Her bir koşul için üçlü okumaların ortalama optik yoğunluk (*Optical Density*, OD) değerleri hesaplandı ve hücresiz kör kuyudan elde edilen OD değerleri hücrelerden elde edilen OD değerinden çıkartılarak arka plan (*background*) normalizasyonu yapıldı. Kontrol kültür ortamında bulunan hücrelerin OD değerlerine göre vinorelbin ve kolşisin uygulanan hücrelerin OD değerlerinin % değişimi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre miktarı \%} = \frac{\text{Madde uygulanmış koşul OD}}{\text{Kontrol koşul OD}} \times 100 \quad (3.2)$$

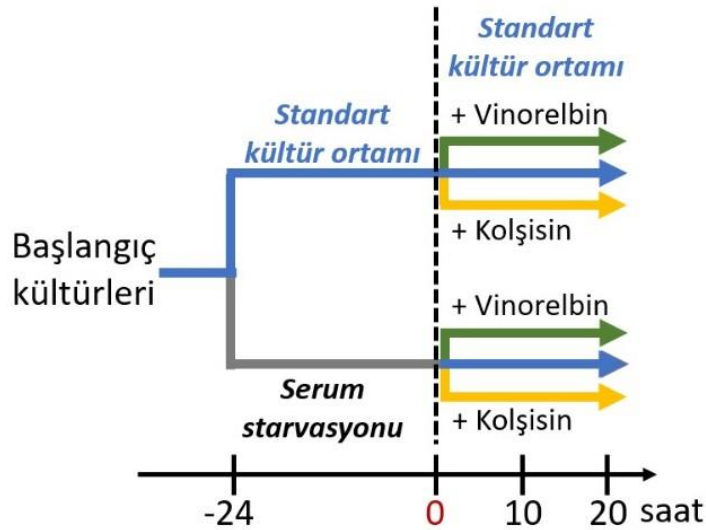
MTT sonuçlarına göre hücreler için sub-toksik kolşisin ve vinorelbin konsantrasyonu 25 nM olarak belirlendi. İkinci etapta çeşitli hücre hatları (L929, 4T1, B16-F10, NCI-H441, SW982, EMT6/AR1, CFPAC-1, hCMEC-D3, 4T1-Red-Fluc, A549, U-87 MG, U87-MG-Red-Fluc, MDA-MB231, NCI-H1299) için 25 nM Vinorelbin ile 24, 48 ve 72 saat MTT deneyi tekrarlandı. Bu çalışmada kullanılacak temel hücreler olan L929, B16F10 ve 4T1 hücreleri için de 25 nM Kolşisin ile MTT'ler tekrarlandı. Bunlara ek olarak, NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16F10 hücrelerinin serum

starvasyonu yapılan ve kontrol koşulları için 25 nM Vinorelbin ve Kolşisin ile 10 ve 20 saat MTT deneyleri yapıldı.

### 3.5. In vitro Analizler İçin Oluşturulan Deney Tasarımı

NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16F10 hücreleri yoğunluğu %30 olacak şekilde 6 kuyucuklu tabakalara uygun besiyerlerinde ekildi. Bir gece hücrelerin tabana yapışması bekledi. Hücreler plaka tabanına yapıştıktan sonra hücrelere serum starvasyonu yapmak için hücreler FBS içermeyen 1,5 mL besiyerinde 24 saat boyunca inkübe edildi. Aynı zamanda, kontrol olarak kullanılan hücreler tam besiyerlerinde de 24 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 3.2, 0. Saat). Bu sürenin sonunda besiyeri toplandı ve ölü hücrelerden veya hücre kalıntılarından arındırılmak için santrifüj edildi (1800 rpm, 5dk) ve süpernatant kısmı saklandı (-80°C'de).

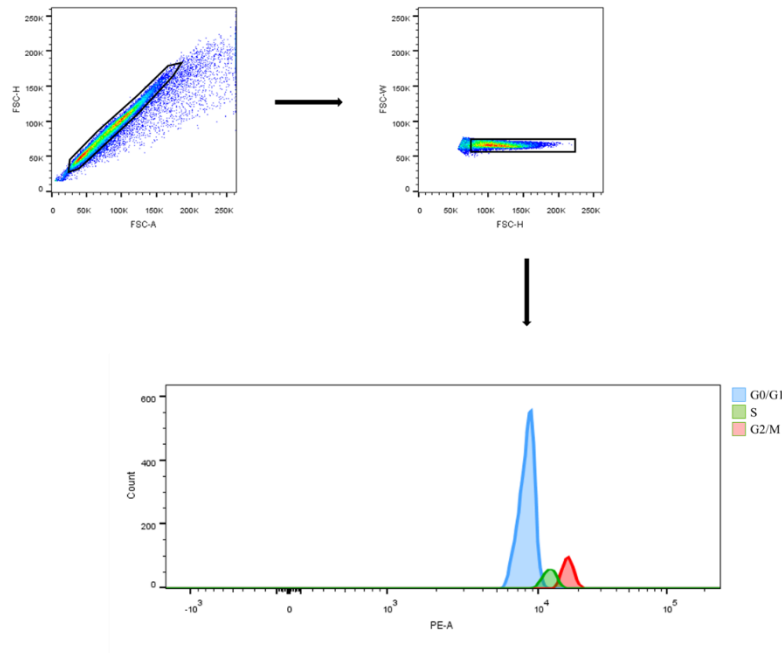
Tabakalardaki hücreler PBS ile yıkanarak hücrelere 25 nM konsantrasyonda vinorelbin veya kolşisin 1,5 mL tam besiyeri içinde eklendi; 10 ve 20 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol koşulu için yine hücreler de aynı şekilde 1,5 mL tam besiyeri içinde 10 saat ve 20 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 3.2). Ardından hücre döngüsü analizleri (Bkz. 3.6) yapıldı ve süpernatant toplandı.



**Şekil 3.2** Vinorelbin ve kolşisin ile muamele edilmiş NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16F10 hücreleri için kullanılan deney tasarımı.

### 3.6. Hücre Döngüsü Analizi

Deney tasarımında planlanan inkübasyonların tamamlanması takiben besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1x PBS ile yıkandı. Ardından, 10x Tripsin/EDTA çözeltisi eklenerek 3-4 dk inkübe edildi. Tam besiyeri ile hücreler toplandı ve santrifüj edildi (1800 rpm, 5dk, +4°C). Daha sonra 1 mL soğuk 1x PBS ile hücreler homojen olarak süspanse edildi. Vorteks üzerinde pastör pipeti ile damla damla 2,5 mL soğuk %99 etanol eklendi ve bir gece +4°C’de bekletilerek fikse edildi. Fikse edilen hücrelere 2 mL 1x PBS eklenerek santrifüj edildi (400g, 5dk, +4°C). Ardından süpernatant atılarak hücrelere 50 µL 0,1 mg/mL RNaz ve 50 µL 2,5 mM PI eklendi. İyi pipetleme yapıldıktan sonra 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 37 µm’lik hücre süzgecinden geçirildi. Hücre döngüsü analizi FACS Aria II akım sitometri cihazı (BD, ABD) ve FACS Diva yazılımı (BD, ABD) kullanılarak floresan yoğunluğuna göre analiz edildi. Hücrelerin tek tek analiz edilebilmesi ve dubletlerden kurtulabilmek için *forward scatter height* (FSC-H) ve *forward scatter area* (FSC-A) dağılım grafiği kullanıldı. Hücrelerin tek tek düştüğünü doğrulamak için *forward scatter width* (FSC-W) ve *forward scatter height* (FSC-H) dağılım grafiği kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hücre döngüsü analizlerinde kullanılan akım sitometri kapılama stratejisi.

### 3.7. Moleküler Teknikler

#### 3.7.1. RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen toplanan hücrelerden RNA izolasyonunu E.Z.N.A Total RNA Kit I (Omega Biotek, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. Bu amaçla kullanılan pipet uçları ve tüpleri RNA ve DNA'dan arındırmak için dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. Altı kuyucuklu plakalara ekilen hücreler tripsin/EDTA protokolüne uygun olarak süspansiyon haline getirildi ve 1x PBS tampon çözeltisi ile yıkandı (1800rpm, 5dk, +4°C). Kit içeriğinde bulunan 1 mL'inde 20 µL β-merkaptotanol olacak şekilde hazırlanan TRK çözeltisinden 350 µL hücre pelletinin üzerine eklendi ve hücrelerin parçalanması için 3 dk vorteks yapıldı. Ardından 1:1 hacimde olmak üzere %70 etanol eklendi ve hafifçe vorteks yapıldı. Karışımdan 700 µL filtreli kolonlara aktararak 10000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüplerine geçen sıvı kısmı uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonlara 250 µL RNA Wash Buffer I eklenerek santrifüj yapıldı. Bundan sonraki tüm aşamalarda santrifüj 10000rpm, +4 °C'de yapıldı. Santrifüj sonrası toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı. Her bir filtreli kolona 75 µL *DNase I digestion* karışımı (73,5 µL *DNase I Digestion Buffer* + 1,5 µL *DNase I* (20 Kunitz/µL) ) eklenerek 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda kolonlara 250 uL RNA Wash Buffer I eklenerek 2 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırılarak kit içeriğinde bulunan ve %100 etanol içeren RNA Wash Buffer II kolonlara 500 µL eklendi. Kolonlar 10000 rpm'da 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüplerine geçen sıvı atılarak RNA Wash Buffer II tekrar eklenerek santrifüj edildi. Kolonların kurumaması ve etanolün uzaklaştırılması için en yüksek hızda (14000 rpm) 2 dk santrifüj yapıldı. Ardından toplama tüpleri uzaklaştırılarak filtreli kolonlar her örnek için ayrı ayrı hazırlanmış DEPC ile muamele edilmiş 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı. Nükleaz içermeyen 40 µL ddH<sub>2</sub>O (*ultra pure and sterile water*) filtreli kolonlara eklendi ve en yüksek hızda (1400 rpm) 2dk santrifüj yapıldı. Filtreler uzaklaştırılarak RNA örneklerini içeren tüpler -80 °C'de saklandı.

RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 230 nm, 260 nm ve 280 nm' de UV spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD) ile ölçüldü. RNA kalitesi A260/280

oranının 1,8-2,0 aralığında ve A260/230 oranının 2,0-2,2 aralığında olması dikkate alınarak belirlendi.

### 3.7.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezi ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England BioLabs, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. Özetle, 2 µL oligo d(T) primeri (50 µM), 1 µg RNA örneği ve son hacim 8 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen dH<sub>2</sub>O mikrofüj tüplerinde karıştırılarak PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) cihazında (*Thermal Cycler*, Thermo Scientific, ABD) 65°C'de 5 dakika tutuldu. Bu aşamanın ardından tüpler mikrosantrifüj yapıldı ve hızlıca buzun üzerine alındı. Her bir tüpe kitin sağladı 2x reaksiyon tamponu (10 µL) ve 10x enzim karışımı (M-MuLV *Reverse* Transkriptaz ve RNaz İnhibitörünü) eklenerek 42°C'de 60 dk ve devamında 80°C'de 5 dakika *Thermal Cycler*'da inkübe edildi. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

### 3.7.3. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)

Gen ekspresyon analizleri için fare *Hmgb1*, *Hspa1b* (HSP70), *Hsp90aa1* (Hsp90), *Nlrp3*, *H3f3a* (H3.3 Histone A), *IL33*, *Ppia* (Siklofilin A) ve  $\beta$ -*aktin* primer oligonükleotid dizileri (Tablo 3.1) ekzon-ekzon birleşme bölgelerine bağlanacak şekilde tasarlandı.

**Tablo 3.1.** PZR analizlerinde kullanılan primerlerin sekansları ve ilişkili bilgileri.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Ürün bazıfti	Genbank No.
<i>Hmgb1</i>	ggcaggagtggcttttgtcc	acatggcttccacctctctga	366	NM_001313894.1
<i>Hspa1b</i>	tgategccggctaaacgtg	cttcacctegaagatgccgt	173	NM_010478.2
<i>Hsp90aa1</i>	gcttggtctaggtattgatgagga	ttccatgctgatgtgctgt	109	NM_010480.5
<i>Nlrp3</i>	accgagacgtgaaggtccta	tcaccagtctggaagaacagg	498	NM_145827.4
<i>H3f3a</i>	tcggtgtagccatcttca	acacctcttacttaccctcc	126	NM_008210.5
<i>IL33</i>	gatgggaagaagctgatggtg	ttgtgaaggacgaagaaggc	140	NM_001360725.1
<i>Ppia</i>	gtctcctcgagctgtttgc	gcgtgtaaagtcaccacct	150	NM_008907.2
<i>B-aktin</i>	cactgtcgagtcgctgcc	tcatccatggcgaactggtg	89	NM_007393.5

PZR reaksiyonu için gerekli bileşenler ve protokol Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD) hariç tüm bileşenler oda sıcaklığına getirilmiş ve vorteks yapılarak iyice karıştırılmıştır.

**Tablo 3.2.** Standart PZR bileşenleri.

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
<b>Taq Tampon çözeltisi (10x)</b>	2,5	1x
<b>dNTP mix (2 mM)</b>	2,5	0,2 mM
<b>MgCl<sub>2</sub>(25 mM)</b>	2,5	2,5 mM
<b>Forward Primer</b>	1	0,2 $\mu\text{M}$
<b>Reverse Primer</b>	1	0,2 $\mu\text{M}$
<b>Taq DNA Polimeraz (5 U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0,25	0,05 U/ $\mu\text{L}$
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	14,25	
<b>cDNA</b>	1	
<b>Son Hacim</b>	25	

PZR reaksiyonu hazırlanırken tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Ana karışım 1,5 mL’lik tüplerde hazırlandı. Sırasıyla, nükleaz içermeyen dH<sub>2</sub>O, Taq tampon çözeltisi, dNTP, primerler ve MgCl<sub>2</sub> tüpe eklendi ve vorteks yapılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra Taq DNA polimeraz enzimi eklenerek karışım 200  $\mu\text{L}$ ’lik PZR tüplerine eşit biçimde (24 uL) dağıtıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan, ilgili genleri ifade ettiği bilinen, fare akciğer, karaciğer, lenf nodu, böbrek, beyin, kemik iliği, kan, meme ve 4T1 tümör dokularından izole edilen RNA’lardan birleştirilerek sentez edilen cDNA karışım örneği tüplere eklendi. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen karışım hazırlandı. PZR tüpleri *Thermal Cycler*’a yerleştirildi ve tüm genler için Tablo 3.3’te belirtilen gradyan PZR programı gerçekleştirildi. Her bir gen için gradyan PZR sonucunda belirlenen optimal bağlanma sıcaklıkları ( *$\beta$ -aktin* ve *Hmgb1*, 60°C; *Hspa1b*, 64°C; *Hsp90aa1* ve *Nlrp3* 65°C; *H3f3a*, *IL33* ve *Ppia*; 63°C) belirlendi.



**Tablo 3.3.** Gradyan PZR protokolü.

<b>İlk Denatürasyon</b>	95°C	30 sn	} 35 Döngü
<b>Denatürasyon</b>	95°C	30 sn	
<b>Bağlanma</b>	58-65	30 sn	
<b>Uzama</b>	72°C	20 sn	
<b>Son Uzama</b>	72°C	5 dk	

### 3.7.4. Gerçek-zamanlı PZR

Her bir gene özgül bağlanma sıcaklığının belirlenmesinin ardından gen ifadesinin kantitatif analizleri için gerçek zamanlı PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri ve protokolü Tablo 3.4’da belirtilmiştir.

**Tablo 3.4.** Gerçek zamanlı PZR bileşenleri.

<b>Bileşenler</b>	<b>Hacim (µL)</b>	<b>Final Konsantrasyon</b>
<b>SYBR Green Supermix çözeltisi (2x)</b>	5	1X
<b>Forward Primer (5 µM)</b>	1	0,5µM
<b>Reverse primer (5µM)</b>	1	0,5µM
<b>cDNA örneği</b>	1	
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2	
<b>Toplam Hacim</b>	10	

Tüm bileşenler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilerek vorteks ile iyice karıştırıldı. 1,5 mL’lik tüplerde SYBR green Süpermix çözeltisi, nükleaz içermeyen su, *forward* ve *reverse* primerler iyice karıştırıldı. Bu ana karışım PZR tüplerine (Biorad, ABD) eşit hacimde (9 µL) dağıtıldı ve üzerlerine ilgili cDNA (1 µL) eklendi. PZR tüpleri gerçek zamanlı PZR cihazına (BIO-RAD Real Time PCR Detection System, ABD) yerleştirildi ve Tablo 3.5’de belirtilen protokol uygulandı. Her bir gen için aşağıda verilen formüle (Formül 3.3) göre gen ifadesindeki göreceli değişim analizi yapıldı. β-aktin referans gen olarak kullanıldı.

**Tablo 3.5.** Gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü.

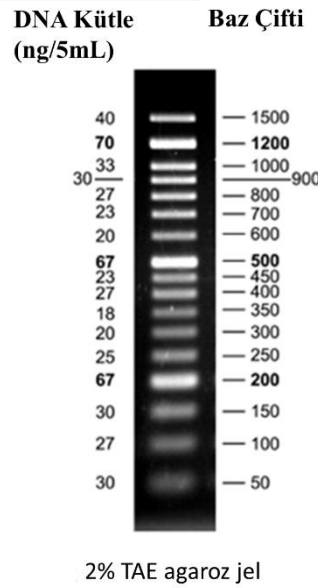
<b>Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu</b>	95°C	3 dk
<b>Denatürasyon</b>	95°C	15 sn
<b>Bağlanma</b>	Primere özgü	30 sn
<b>Uzama</b>	72°C	20 sn
<b>Melting-curve analizi</b>	55-95°C, (0.5°C artış)	5 sn/adım

$$-\Delta\Delta Ct = -[(\Delta Ct \text{ hedef gen} - \Delta Ct \text{ kontrol gen})] \quad (3.3)$$

$$= -[(Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen})] - [(Ct \text{ kontrol gen} - Ct \text{ referans gen})]$$

### 3.7.5. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin elektroforetik ayırlama ile doğrulaması için 1X TBE tampon çözeltisi içinde %2'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz TBE karışımı mikrodalga fırında eritildi. Sıcaklık 60°C'ye ulaştığında final konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde etidyum bromür çözeltisi eklendi. Agaroz jel kalıba döküldü ve kuyuları oluşturmak için taraklar yerleştirildi. Oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat inkübe edildikten sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve 1X TBE çözeltisi ile dolu tanka yerleştirildi. Her bir PZR ürünü (15 µL), 1 µL 6x yükleme boyası (*loading dye*) ile karıştırılarak jeldeki kuyulara yüklendi. 5 µL DNA belirteci de ilk kuyuya yüklendi (Şekil 3.4). Jele yüklenen örnekler 100 V'de, 30-50 dk süresince oda sıcaklığında elektroforez tankında yürütüldü. Bu süre sonunda PZR ürünü, görüntüleme sisteminde (Kodak Gel Logic 1500, ABD) UV ışık altında görüntülendi.



Şekil 3.4. 50 bç DNA belirteci (GeneDireX, ABD).

### 3.7.6. Süpernatandan DNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Uygulanan koşullar altında gerçekleştirilmiş hücre kültürlerinden toplanan süpernatant örneklerine 1:1 oranında etanol (96-100%) eklenerek vorteks yapıldı. Devamında uygulanan tüm santrifüjler 11000 rpm, 1dk, +4°C’de yapıldı. Ardından, örnekler filtrelili kolonlara yüklendi ve santrifüj yapıldı. Toplama tüplerinde toplanan sıvı tekrar filtrelili kolona yüklenerek santrifüj yapıldı (11000 rpm, 1dk). Toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırılarak filtrelili kolonlara 500 µL Buffer BW. eklendi ve santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvı atılarak kolona 600 µL Buffer B5 eklendi ve santrifüj yapıldı. Ardından kolonların kuruması ve etanolün uzaklaştırılması için filtrelili kolon 11000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Filtrelili kolonlar 1,5 mL’lik tüplere yerleştirildi ve 20 µL Buffer BE eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi ve santrifüj yapılarak tüpler içinde toplanan DNA örnekleri -80°C’de saklandı.

Süpernatandan izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu Qubit dsDNA BR Assay Kiti (Invitrogen, ABD) ile belirlendi. Qubit çalışma solüsyonu (200 µL) Qubit reaktifinin 1:200 oranında Qubit tamponu içinde dilüsyonu ile hazırlandı. Standart (0.001, 0.1, 10, 1000, 100000 ng/uL) ve örnekler aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 3.6). Örnekler 2-3 sn vorteksenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. Tüpler Qubit Fluorometer 4 cihazına (Thermo Fisher Scientific, ABD) yerleştirildi ve ölçüm yapıldı.

**Tablo 3.6.** Qubit DNA konsantrasyonu sırasında kullanılan standart ve örneklerin hazırlanması.

	<b>Standartlar</b>	<b>Örnekler</b>
<b>Qubit çalışma solüsyonu</b>	190 µL	180-199 µL
<b>Standartlar</b>	10 µL	-
<b>Örnekler</b>	-	1-20 µL
<b>Final Hacim</b>	200µL	200µL

### 3.8. İmmünfloresan Boyama

Yirmidört kuyucuklu tabakaların tabanına 10 mm çaplı daire lameller yerleştirildi. Ardından NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleri lamellerin üzerine kendi tam besiyerlerinde ekildi. Bir gece inkübatörde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) bekletildi. Devamında kuyulardan besiyerleri uzaklaştırılarak 25 nM vinorelbin veya 25 nM kolşisin tam besiyeri içinde eklendi. Kontrol olarak da vinorelbin veya kolşisin içermeyen tam besiyeri eklendi. İnkübatörde 20 saat boyunca tutuldu. İnkübasyonun ardından kuyular 1x PBS tampon çözeltisi ile yıkandı. Hücreleri fikse etmek için %4 paraformaldehit veya formaldehit çözeltisi eklenerek 25 dk inkübe edildi. Ardından, 1x PBS tampon çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı ve 3 dk boyunca %0,1 Triton X-100 ile muamele edildi. Devamında, 1x PBS tampon çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı. Buzağı serum albümin (%2 BSA) ile 1 saat bloklama yapıldı.

Mikrotübül ve aktin iskeletinin boyanması için, blokajın ardından hücreler 1:200 paklitaksel-488, 1:400 falloidin-555 ve 1:1000 DAPI içeren %1 BSA eklenmiş 1x PBS ile 2 saat inkübe edilmiştir. Yıkama sonrasında, blokajın ardından hücreler 1:200 tavşan anti-fare hmgb1 primer antikor (Abcam, ABD) içeren %1 BSA eklenmiş 1x PBS ile 2 saat inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonunun ardından, hücreler 3 kez 1x PBS ile yıkandı. Sekonder antikor inkübasyonu 1:500 seyreltilmiş anti-tavşan Alexafluor-555 işaretli antikor (Abcam, Birleşik Krallık) ve 1:1000 seyreltilmiş DAPI ile 2 saat yapıldı. Tekrarlı yıkamaların ardından lameller solma karşıtı kapatma çözeltisi (Abcam, Birleşik Krallık) ile lamaların üzerine kapatıldı. Görüntüleme epifloresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) ile, dijital analizler Image-J (NIH, ABD) yazılımı ile yapıldı.

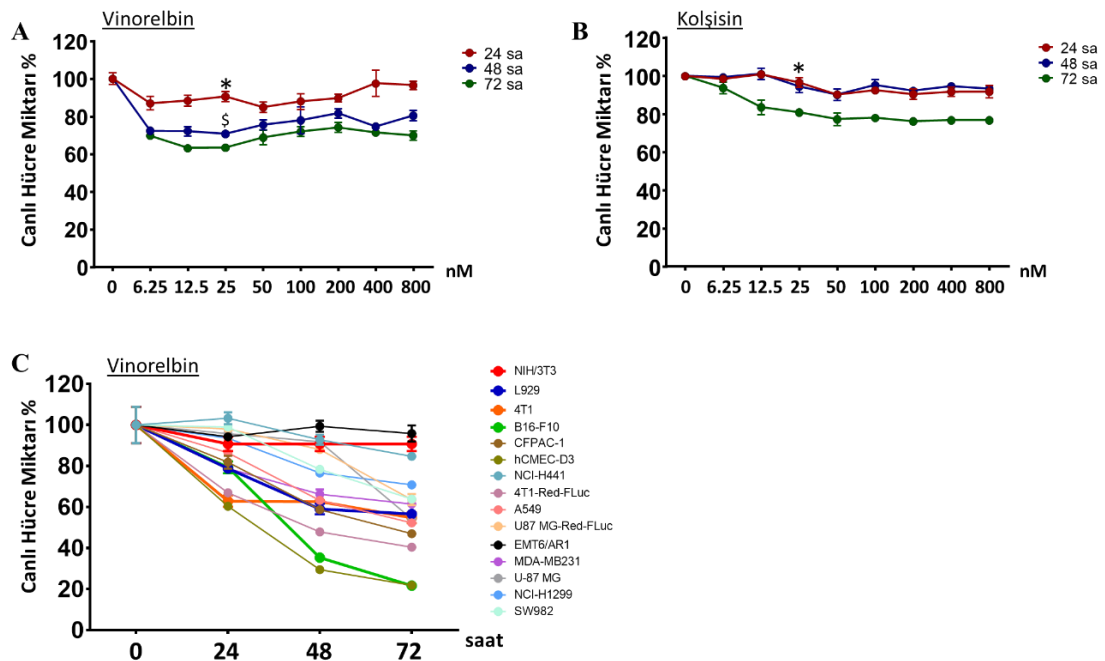
### 3.9. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar en az üç bağımsız deneyden elde edildi. İstatistiksel farklılıkları göstermek için Mann-Whitney U testi, *Student's paired* veya *unpaired* testleri, ANOVA veya Ki-kare testleri kullanıldı. P değerleri  $\leq 0,05$  olduğunda, farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bu istatistiksel analizler boyunca ortalama değerler standart sapma (SD) veya standart hata (SE) ile birlikte sunuldu.

## 4.BULGULAR

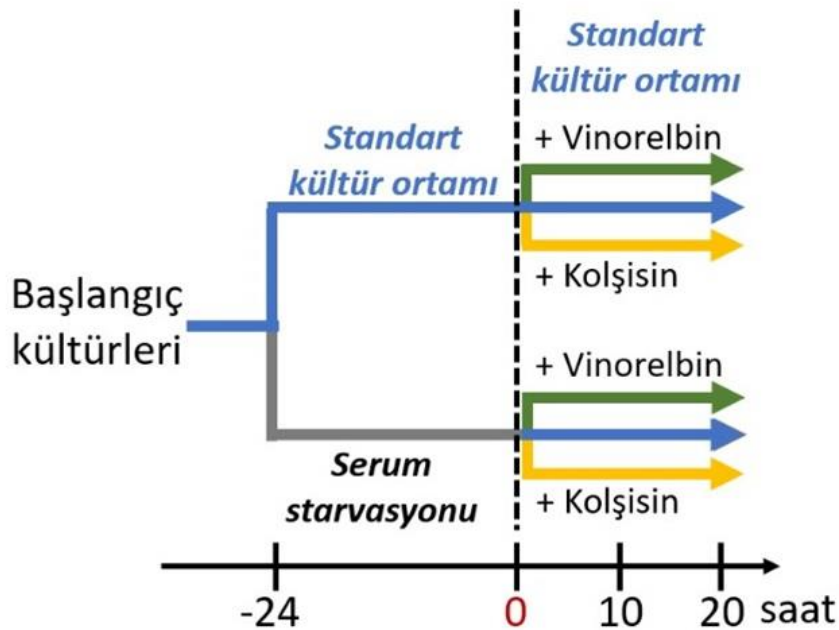
### 4.1 Mikrotübül İnhibitörü Olarak Kullanılan Kolşisin ve Vinorelbinin Hücre Canlılığına Etkisi

Vinorelbin ve kolşisin ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen hücrelerin canlılığı MTT yöntemi ile analiz edildi. Artan konsantrasyonlarda (0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 nM) vinorelbin ve kolşisin ilk etapta NIH/3T3 fare fibroblast hücre hattına uygulandı. Kolşisin veya vinorelbin uygulanmayan kontrol koşuluna göre normalizasyon yapılarak canlı hücre miktarındaki yüzde değişim belirlendi. Hücre canlılığına büyük ölçüde zarar vermeyen konsantrasyonun belirlenmesi amaçlandı. Vinorelbin konsantrasyonunun 25 nM olduğu koşulda 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilen hücrelerin canlı hücre miktarı sırasıyla %90,54±2,59, %70,80±1,289 ve %63,36±0,51 olarak belirlendi. Aynı konsantrasyonda uygulanan kolşisin için ise 24, 48 ve 72 saat canlı NIH/3T3 hücre miktarı sırasıyla %96,58±2,26, %94,38±3,69 ve %80,89±1,95 olarak belirlendi (Şekil 4.1 A ve B).



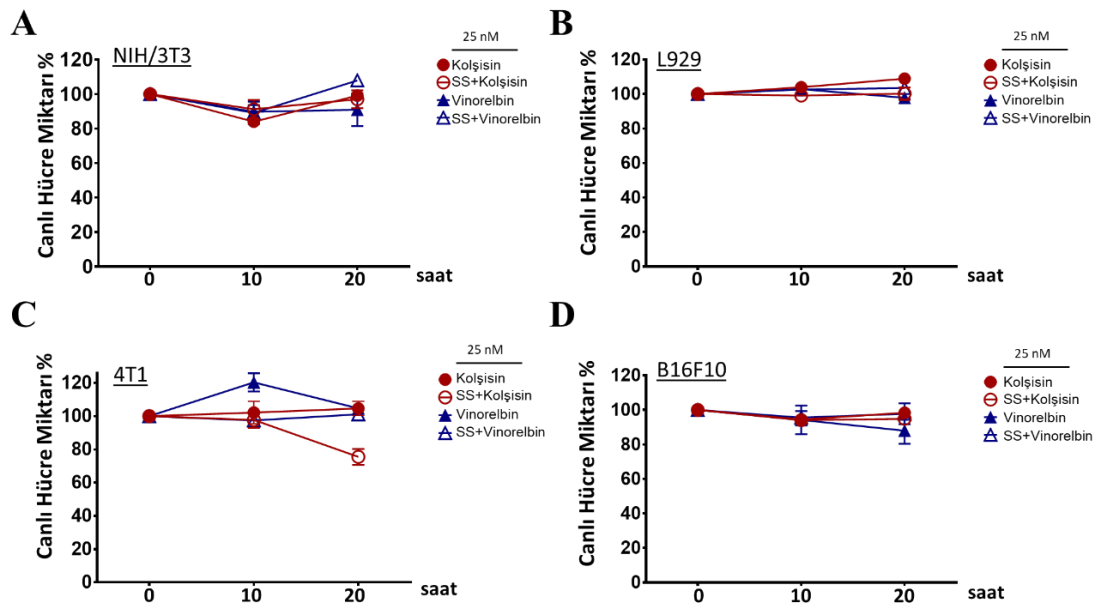
**Şekil 4.1.** Kolşisin ve vinorelbin için toksik olmayan dozun belirlenmesi. A) Vinorelbin ve (B) kolşisin uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyon sonucunda elde edilen canlı hücre miktarları MTT yöntemi ile analiz edildi. C) Vinorelbinin (25 nM) 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele sonrasında 15 farklı hücre hattının canlı hücre miktarına etkisi. (\*,24-72sa; \$,48-72sa; n ≥3, p< 0,05).

NIH/3T3 fare fibroblast hücreleri üzerinde vinorelbinin sub-toksik konsantrasyonu 25 nM olarak belirlendi ve 15 farklı hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. Tüm hücre hatlarında 24 saat için canlı hücre miktarının %60'ın altına düşmediği görüldü. İnkübasyonun 48. saatine bakıldığında B16-F10 fare melanom, 4T1-luc fare meme kanseri ve hCMEC/D3 insan beyin endotel hücrelerinde canlı hücre miktarı %50'nin altına geriledi. Diğer hücre hatlarında ise, canlı hücre miktarı %60'ın altına düşmedi. B16-F10 ve hCMEC/D3 hücreleri 72 saatte oldukça olumsuz etkilenmiş ve hücre ölümü ciddi oranda artmıştır. Canlı hücre miktarı B16-F10 için  $21,64 \pm 0,27$ , hCMEC/D3 için  $21,81 \pm 0,31$  olarak belirlendi. Diğer hücre hatlarında ise, genel olarak 72. saatte canlı hücre miktarının %50'nin altına düşmediği görüldü. Bu çalışmada B16-F10'a ek olarak kullanılacak temel hücre hatları olan NIH/3T3, L929 ve 4T1 hücrelerinin vinorelbin ile muamele edildiği 72 saat sonundaki canlı hücre miktarları ise, sırasıyla  $63,38 \pm 0,93$ ,  $56,60$  ve  $54,71 \pm 2,57$  olarak belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.2. Vinorelbin ve kolşisin ile muamele edilen hücreler için deney tasarımı.

Vinorelbin ve kolşisin sitostatik mekanizması göz önünde bulundurulduğunda, hücre döngüsüne bağımlı bir etki izlenebileceği hipotezi oluşturuldu. Hücrelerin döngü fazlarını senkronize edebilmek amacıyla serum starvasyonu yapıldı. Bunun için NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleri serumsuz ortamda 24 saat boyunca inkübe edildi. Ardından hücreler tam kültür ortamına alındı ve 25 nM vinorelbin veya kolşisin ile 10 saat ve 20 saat boyunca muamele edilerek hücrelerin canlılık durumu incelendi (Şekil 4.2). Tüm koşullar için 10 saat inkübasyonun toksik bir etki oluşturmadığı, 20 saat inkübasyonunun ardından da canlı hücre miktarının %85'in altına düşmediği gözlemlendi. Sadece serum starvasyonu yapıp 25 nM kolşisin uygulanan 4T1 hücrelerinde 20. saatte canlı hücre miktarı  $75,49 \pm 4,75$  olarak belirlendi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Standart kültür ortamında tutulan ve serum starvasyonu yapılan hücrelerde 10 saat ve 20 saat 25nM vinorelbin ve kolşisin inkübasyonunun ardından yapılan MTT analizi sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, ve (D) B16-F10 hücreleri ile gerçekleştirilen canlılık analizlerine ait sonuçlar. (SS, Serum Starvasyonu;  $n \geq 3$ ).

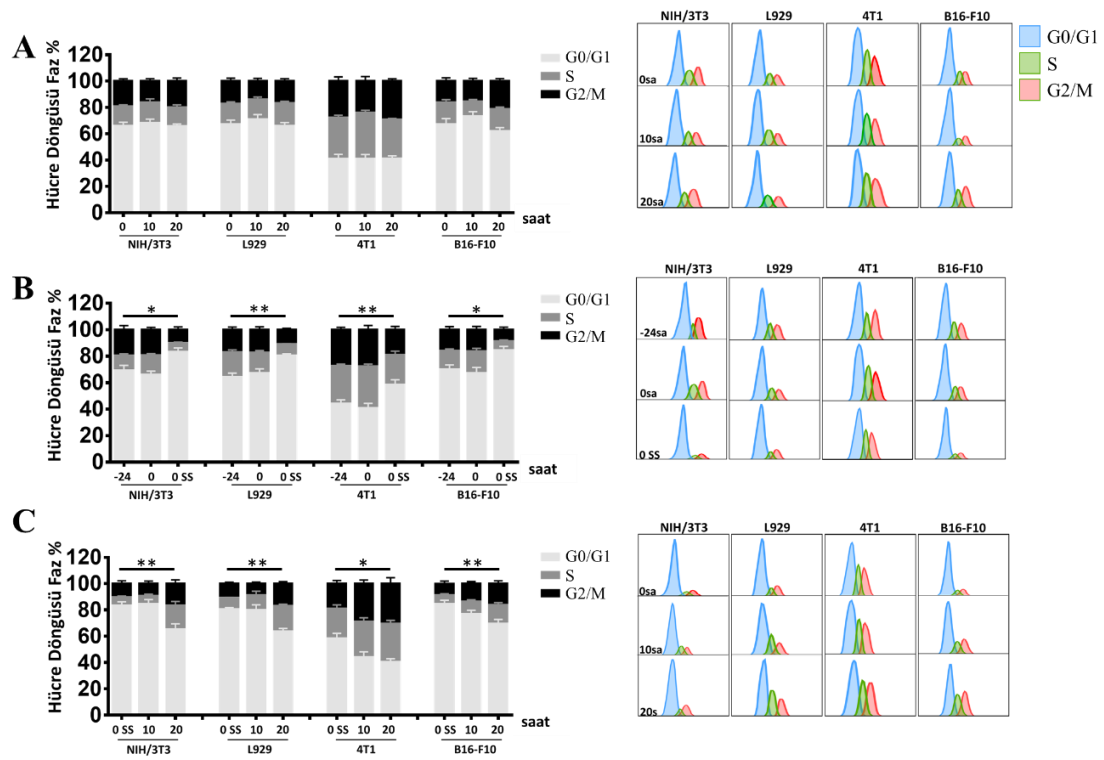
#### 4.2. Kolşisin ve Vinorelbinin Hücre Döngüsüne Etkisi

Vinorelbin ve kolşisin ile muamele edilen NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerin 20 saat boyunca gerek kontrol gerekse starvasyon koşullarında olumsuz olmayacak konsantrasyonun seçilmesinin ardından bu ajanların hücre döngüsüne etkisi incelendi. Standart kültür ortamında tutulan kontrol hücreler 10 saat ve 20 saat



boyunca kültürde devam ettirildiğinde hücre döngüsü fazlarında değişim gözlenmedi (Şekil 4.4.A). Fibroblast hücrelerini (NIH/3T3, L929) ve kanser hücrelerini (4T1, B16-F10) senkron hale getirebilmek için serum starvasyonu yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca serum içermeyen besiyerlerinde inkübe edildiğinde G1 fazındaki hücrelerin oranında artış gözlemlendi (Şekil 4.4 B). Başlangıçta (-24. sa) NIH/3T3, L929 ve B16-F10 hücrelerinin G1 fazı, sırasıyla,  $69,17 \pm 3,89$ ,  $64,26 \pm 3,00$ ,  $69,92 \pm 3,49$  iken; 4T1 hücreleri için  $44,18 \pm 2,91$  olarak belirlendi. 4T1 hücrelerinin S fazı yüzdesi diğer hücrelere kıyasla daha fazlaydı. Bu da 4T1 hücrelerinin daha hızlı çoğaldığını göstermektedir. Hücreler 24 saat boyunca standart kültür ortamında inkübasyona devam edildiğinde G1, S ve G2/M fazlarında başlangıca (-24h) göre değişim gözlenmedi (Şekil 4.3.B). NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16F10 hücrelerine serum starvasyonu uygulandığında başlangıca (-24. sa) göre G1 fazı artış gösterdi. NIH3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleri için serum starvasyonu sonrasında G1 fazı sırasıyla  $83,27 \pm 2,98$ ,  $80,54 \pm 1,21$ ,  $58,20 \pm 4,07$  ve  $84,54 \pm 2,77$  olarak bulundu (Şekil 4.3.B).

Tüm hücre hatları için 24 saat serum starvasyonunun ardından hücrelerin çoğalmaya devam etmesini sağlamak amacıyla ortam standart serum içeren besiyeri ile değiştirildi. NIH/3T3 ve L929 fare fibroblast hücrelerinde 10 saat standart besiyeri ile inkübasyonun ardından G1, S ve G2/M fazlarında değişim gözlenmezken; 4T1 ve B16-F10 kanser hücrelerinde G1 fazında azalma ve G2/M fazında artış gözlemlendi. NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 için sırasıyla G1 fazındaki hücre yüzdesi  $84,65 \pm 3,24$ ,  $80,01 \pm 3,64$ ,  $44,18 \pm 4,0$ ,  $76,9 \pm 2,83$ ; G2/M fazındaki hücre yüzdesi  $9,41 \pm 1,99$ ,  $8,72 \pm 1,13$ ,  $28,83 \pm 2,77$ ,  $13,59 \pm 1,67$  olarak belirlendi (Şekil 4.4.C). Aynı şekilde tüm hücreler serum starvasyonunun ardından 20 saat boyunca kültür ortamında inkübe edildiğinde, G1 fazında azalma, S ve G2/M fazında ise artış gözlemlendi. NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 için sırasıyla G1 fazındaki hücre yüzdesi  $65 \pm 4,20$ ,  $63,73 \pm 2,24$ ,  $40,39 \pm 2,59$ ,  $69,55 \pm 3,34$ ; G2/M fazındaki hücre yüzdesi  $16,62 \pm 2,86$ ,  $16,88 \pm 1,59$ ,  $30,43 \pm 4,56$ ,  $16,23 \pm 2,17$  idi (Şekil 4.3.C).



**Şekil 4.4.** NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinin akım sitometrik hücre döngüsü analizi sonuçları. A) Standart kültür ortamında inkübe edilen hücrelerin 0, 10 ve 20. Saatte hücre döngüsü analizi sonuçları. B) Hücrelerin başlangıçta (-24 sa) ve 24 saat standart kültür ortamında tutulduktan sonra (0 sa) ve 24 saat serum starvasyonu (0 SS) uygulandıktan sonra hücre döngüsü analizi sonuçları. C) Hücrelerin 24 saat serum starvasyonu ve starvasyonun ardından 10 saat ve 20 saat standart kültür ortamında inkübe edildikten sonra hücre döngüsü analizi sonuçları. ( $n \geq 6$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Çalışmada kullanılan NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleri 10 saat ve 20 saat olmak üzere 25 nM kolşisin veya vinorelbin ile muamele edilerek hücre döngüsü fazlarına etkileri incelendi. Fibroblast hücrelerinde (NIH/3T3, L929) 10 saat boyunca kolşisin ile inkübasyon sonrasında belirgin bir değişim olmazken, kanser hücrelerinin (4T1 ve B16-F10) G2/M fazında artış, G1 fazında ise azalma eğilimi belirlendi. 4T1 ve B16-F10 hücreleri için sırasıyla, 10 saat kolşisin inkübasyonu sonucu G1 fazı  $\%34,81 \pm 17,55$ ,  $\%51,09 \pm 7,09$  ve G2 fazı  $\%38,11 \pm 47,18$ ,  $\%31,41 \pm 4,59$  olarak belirlendi. Kolşisin ile inkübasyon 20 saate uzatıldığında ise NIH/3T3, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinin G2 fazında belirgin bir artış gözlenirken, L929 hücrelerinin hücre döngüsü fazlarına etkisi görülmedi. NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleri için, sırasıyla, G1 fazındaki hücre yüzdesi  $\%34,61 \pm 5,16$ ,  $\%65,33 \pm 4,75$ ,  $\%33,65 \pm 5,44$ ,

%23,87±4,91; G2 fazındaki hücre yüzdesi %47,23± 3,53, %17,43± 0,70, %43,19±9,48, %57,61± 5,69 olarak belirlendi (Şekil 4.5A).

Hücreler 24 saat serum starvasiyonuna tabi tutulduktan sonra, standart kültür ortamına alınarak 25nM kolşisin ile 10 saat muamele edildiğinde NIH/3T3, L929, B6F10 hücrelerinin G1, S ve G2/M fazlarında değişim görülmedi. Ancak, 4T1 hücrelerinin G2 fazında artma, G1 fazında azalma eğilimi izlendi; G1 fazı %41,69±8,03, G2 fazı %36,84±4,86 olarak belirlendi. Kolşisin ile muamele 20 saate uzatıldığında ise, tüm hücre hatlarının G2 fazında artış ve G1 fazında azalış gözlenirken bu fark kanser hücreleri 4T1 ve B16F10 hücrelerinde daha açık şekilde görüldü. NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleri için sırasıyla G1 fazındaki hücre oranı %64,84±10,04, %61,85±3,79, %33,12±4,70, %27,10±7,17; G2 fazındaki hücre oranı %20,17±7,14, %19,59±0,50, %47,34±6,07, %58,09±11,41 idi (Şekil 4.5.B).

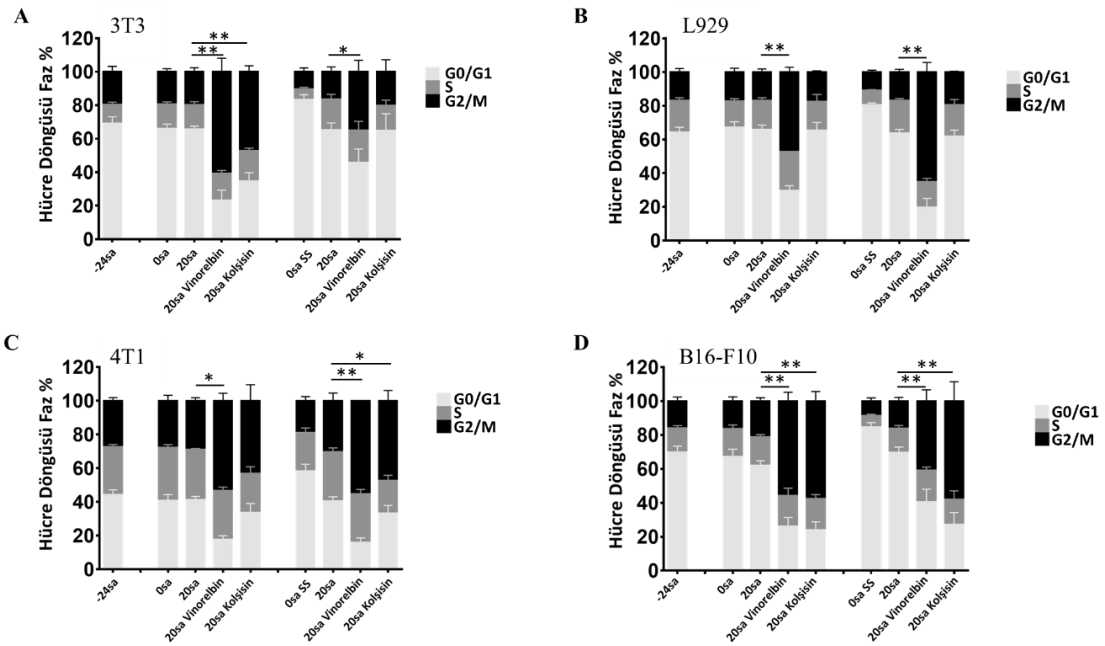


Vinorelbin ile inkübasyon süresi 20 saate uzatıldığında ise tüm hücre hatlarının G2/M fazındaki hücre oranında artış gözlenirken en belirgin artış NIH/3T3 ve B16-F10 hücrelerinde görüldü (Şekil 4.5 C).

Serum starvasyonunun ardından tam besiyeri içinde vinorelbin uygulandığında ise NIH/3T3, L929 ve B16F10 hücrelerinin hücre döngüsü fazlarında bir değişim gözlenmedi. Fakat, 4T1 hücrelerini 10 saat süre boyunca vinorelbine maruz bıraktığımızda G2/M fazındaki hücre yüzdesinde anlamlı bir artış vardı. Vinorelbin ile inkübasyon süresi 20 saate uzatıldığında ise kolşisin ile benzer şekilde tüm hücre hatlarının G2/M fazındaki hücre yüzdesinde belirgin bir artış görüldü (şekil 4.5.D).

Genel olarak, kolşisin ve vinorelbinin hücre döngüsü üzerindeki etkisinin 20 saat süren inkübasyonlarda daha belirgin olduğu görüldü. Bu sebeple 20 saat verileri her bir hücre hattı için kendi arasında kıyaslanmıştır (Şekil 4.6). Tüm hücreler standart kültür ortamında 20 saate kadar tutulduğunda hücre döngüsü fazlarında değişim görülmedi. Ancak, 20 saat boyunca vinorelbin veya kolşisin ile muamele edildiğinde G2/M fazında belirgin bir artış görüldü. Vinorelbinin NIH/3T3, L929 ve B16-F10 hücrelerinde vinorelbinin G2/M fazına etkisi kolşisinden daha fazla olduğu görülürken, 4T1 hücrelerinde vinorelbin ve kolşisin benzer etki oluşturdu. İlginç olarak, L929 hücrelerinde 25 nM kolşisinin hücre döngüsü fazlarına etki etmediği belirlendi. Tüm hücrelere bakıldığında vinorelbinin NIH/3T3 hücrelerini, kolşisinin ise B16-F10 hücrelerinin döngüsünü etkilediği görüldü. Hücre döngüsü fazlarını senkron hale getirmek için starvasyon yapıldığında tüm hücrelerde G1 fazındaki hücre oranı artış gösterdi. En az artışı gösteren hücre 4T1 idi. Serum starvasyonu ile senkronizasyonun ardından hücreler 20 saat boyunca tam besiyerinde tutulduğunda hücre döngüsü fazlarının başlangıçtaki (-24. sa) oranlara geri döndüğü görüldü (Şekil 4.6). Hücreler, starvasyonun ardından tam besiyeri içinde 20 saat boyunca vinorelbin veya kolşisin ile tutulduğunda ise tüm hücrelerde G2/M fazı oranında artış belirlendi. NIH/3T3, L929 ve B16/F10 hücrelerinde vinorelbin uygulamasıyla G2/M artışı kolşisin uygulamasıyla olan artıştan daha fazla olduğu görüldü. 4T1 hücrelerinde ise G2/M oranındaki artış kolşisin uygulandığında vinorelbine göre daha fazla olarak

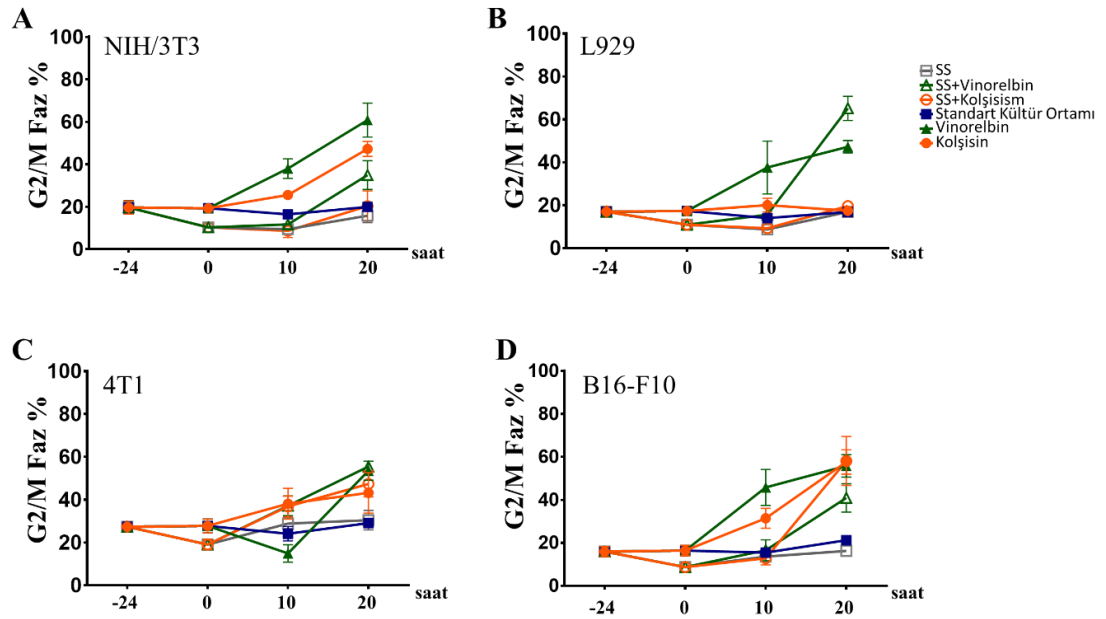
belirlendi. Vinorelbin uygulaması ile G2/M oranında en fazla artış görülen hücre L929 idi. Kolşisin ile en fazla G2/M artışı gösteren hücre B16-F10 idi (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** NIH3T3, L929, B16F10 ve B16-F10 hücrelerinin 20 saat boyunca vinorelbin ve kolşisin uygulaması sonrası hücre döngüsü analizi. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücreleri standart kültür ortamında veya serum starvasyonu ardından 20 saat boyunca tam besiyeri içinde vinorelbin veya kolşisin ile inkübe edildi. Hücre döngüsü fazlarındaki yüzde değişimi akım sitometri ile analiz edildi. ( $n \geq 3$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

Tüm hücrelerde vinorelbin ve kolşisin G2/M oranını etkilediği görüldüğü için zamana bağlı değişim ayrıca grafiklendi. Standart kültür ortamında devam ettirilen tüm hücrelerin G2/M oranında değişim gözlenmedi (Şekil 4.6). Aynı şekilde serum starvasyonu ardından tam besiyerinde 20 saate kadar inkübasyon devam ettirildiğinde de G2/M oranında değişim belirlenmedi. Tüm hücreler hem starvasyon ardından hem de kontrol (standart kültür) ortamında vinorelbin veya kolşisin ile 20 saate kadar muamele edildiğinde zamana bağlı G2/M oranında artış eğilimi gösterdi. Standart kültür ortamında tutulan hücrelere 10 saat boyunca vinorelbin veya kolşisin uygulandığında tüm hücrelerde anlamlı bir G2/M artışı gözlenirken, 4T1 hücrelerinde vinorelbin ile muamele sonucunda azalma belirlendi. L929 hücrelerinde ise kolşisin ile herhangi bir değişim belirlenmedi. Starvasyonun ardından vinorelbin veya kolşisin uygulandığında ise G2/M fazındaki hücre oranında değişim görülmedi. Ancak 4T1

hücrelerinde hem kolşisin hem de vinorelbin uygulandığında G2/M oranında yığılma belirlendi.

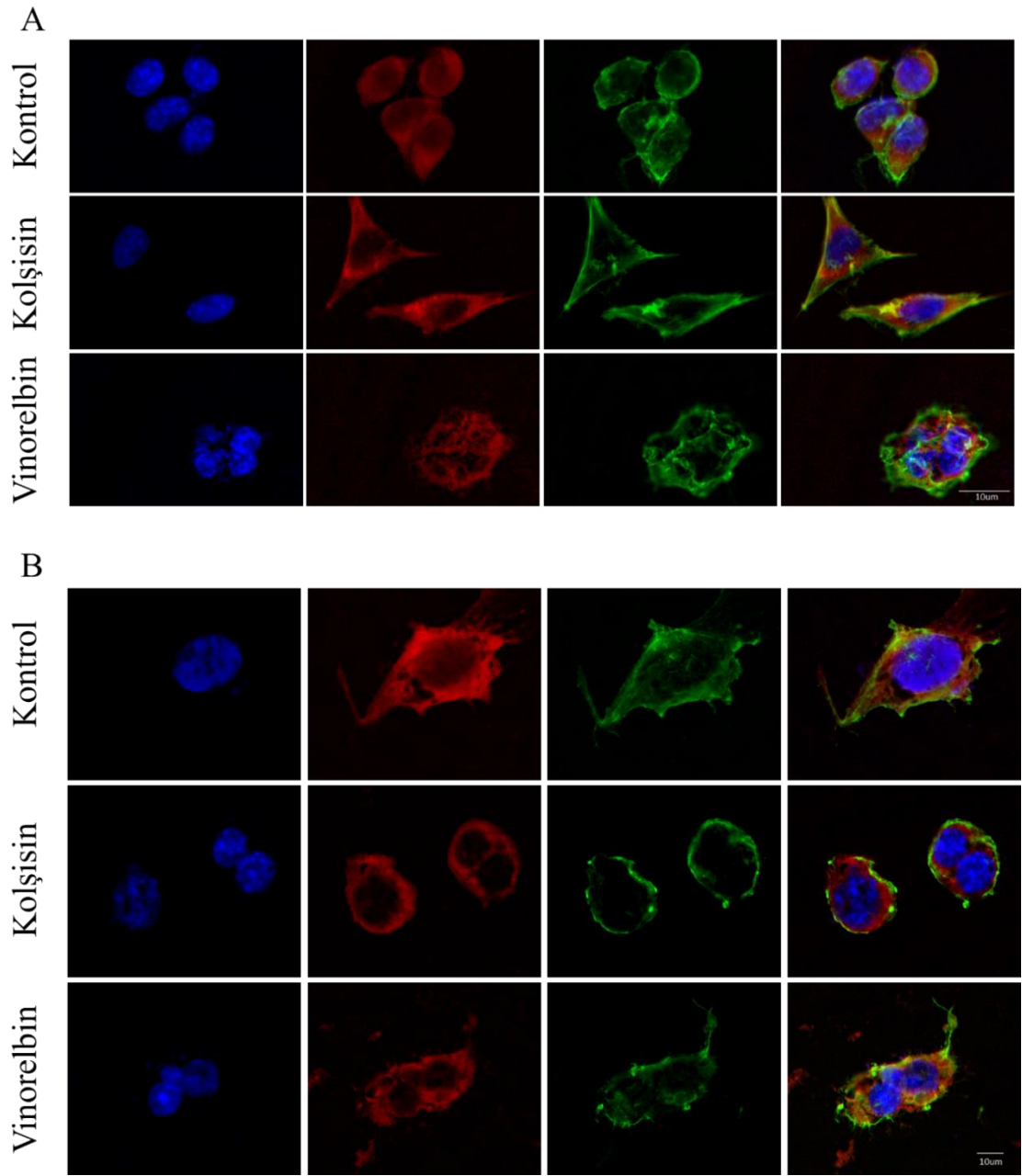


**Şekil 4.7.** A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinin G2/M faz oranındaki değişim. Hücreler standart kültür ortamında veya serumsuz besiyerinde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra tam besiyeri içinde vinorelbin veya kolşisin ile 20 saate kadar inkübasyon devam ettirildi. (n≥3)

Bunun yanı sıra hem standart kültür ortamında tutulan hem de starvasyon yapılan hücrelerde vinorelbin ve kolşisin uygulama süresi 20 saate uzatıldığında G2/M fazı yüzdesinde belirgin bir artış belirlendi. NIH/3T3 hücrelerinde G2/M oranında en belirgin artış, standart kültür ortamında kolşisin ve vinorelbin uygulamasında görüldü. Bu orandaki artış vinorelbin uygulamasında kolşisine nispeten daha fazlaydı. Diğer taraftan, L929 hücrelerinde kolşisin uygulanan koşulların herhangi birinde G2/M fazında bir değişim gözlenmedi. Ancak, 20 saat boyunca vinorelbin uygulaması ile bu hücrelerin G2/M oranında anlamlı bir artış belirlendi (Şekil 4.7). Serum starvasyonu ardından uygulanan vinorelbin ile belirlenen artış standart kültürün devamında uygulanan vinorelbine göre daha fazlaydı. 4T1 hücrelerinde ise, vinorelbin ve kolşisin uygulanan koşulların tamamında G2/M oranında artış belirlenirken, koşullar arasında anlamlı bir fark görülmedi. B16-F10 hücrelerinde G2/M oranındaki artış ise vinorelbin ve kolşisin uygulanan tüm koşullarda artış gösterirken, serum starvasyonu ardından uygulanan vinorelbin ile olan artış diğer koşullara göre kısmen daha az olarak belirlendi (Şekil 4.7).

NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16F10 hücreleri 20 saat standart kültür ortamında, vinorelbin veya kolşisin ile inkübe edildiğinde G2/M fazındaki artışın mikrotübülleri etkileyerek gerçekleştirdiğini görebilmek için hücre iskeletindeki değişimler incelendi. Mikrotübüller floresan konjuge paklitaksel ve aktin floresan konjuge falloidin boyaması ile gösterildi (Şekil 4.8 A-B). Kontrol hücrelerinde mikrotübüller sitoplazma içerisinde homojen dağılım gösterirken, vinorelbin ile muamele edildiğinde hem L929 hem de B16F10 hücrelerinde mikrotübüller çekirdek etrafında yoğunlaşmış olarak görüntülendi. Kolşisin uygulandığında ise L929 hücrelerinde mikrotübül yapısında kontrol hücreleri ile fark görülmedi. B16/F10 hücrelerinde ise, kolşisin ile 20 saat muamelenin ardından hücre çekirdekleri kümelenmiş halde izlendi. Hem L929 hem de B16F10 hücreleri vinorelbin ile 20 saat tutulduğunda, aynı şekilde çekirdekte kümelenme ve mikrotübüllerin çekirdek etrafında yığılımı görüldü (Şekil 4.8). Aktin iskeleti ise, mikrotübüller ile benzer şekilde kontrol hücrelerinde bütünlüğünü korurken, vinorelbin ve kolşisin varlığında hem L929 hem de B16-F10 hücrelerinde homojen dağılımını kaybetti. L929 hücrelerine kolşisin uygulandığında aktin iskeletinde kontrol hücreleri ile arasında fark görülmedi (Şekil 4.8).

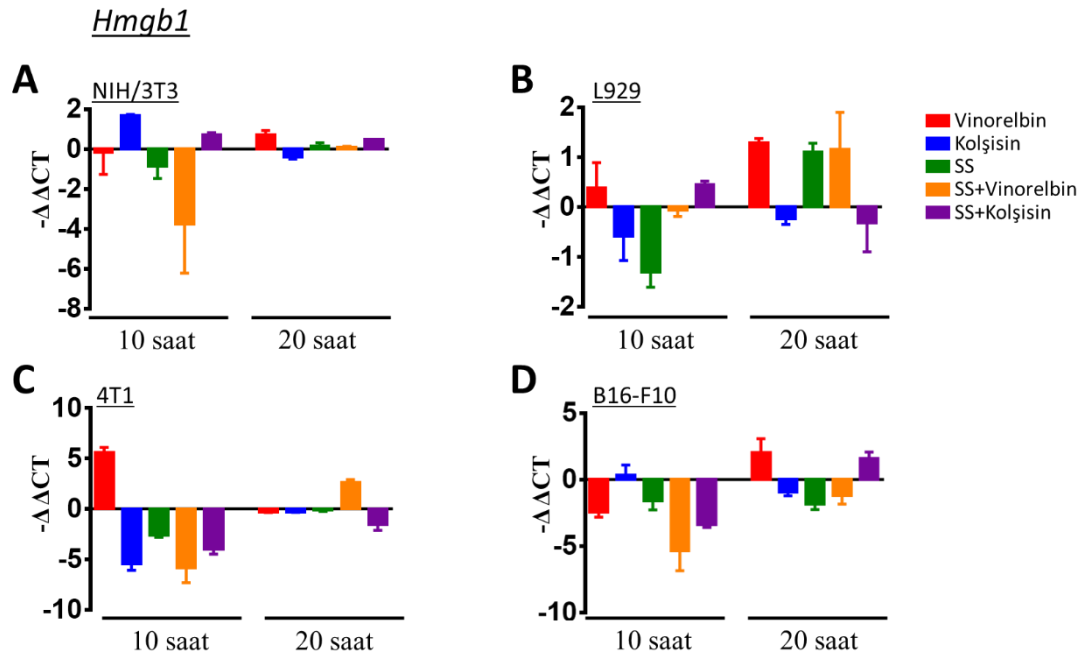




**Şekil 4.8.** Vinorelbin ve kolşisin etkisi altında hücrelerin mikrotübül ve aktin iskeletindeki değişimler temsili görüntüsü. A) L929, (B) B16-F10 hücreleri 20 saat 25nM Vinorelbine maruz bırakılmıştır. Ardından Mikrotübül ve aktin yapıları floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. (Nükleus, mavi; mikrotübüller, kırmızı; aktin, yeşil). Ölçek çubuğu 10  $\mu\text{m}$ 'dir.

### 4.3. Kolşisin ve vinorelbinin DAMP genlerinin ifadesine etkisi

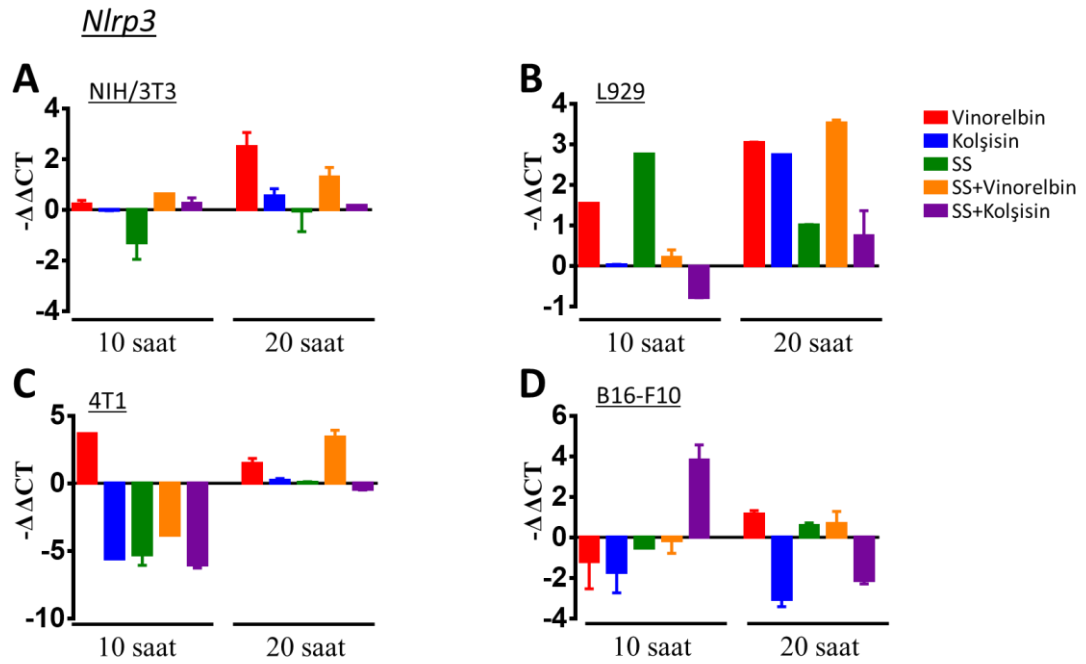
NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinin ifade ettiği DAMP olarak immünyete etkisi olduğu bilinen 7 farklı genin kolşisin ve vinorelbin etkisi ile ekspresyon düzeylerindeki değişim qPCR ile analiz edildi. İfade düzeylerindeki değişim kontrol hücrelerine ve B-aktin düzeyine göre  $-\Delta\Delta CT$  hesaplanarak belirlendi.



**Şekil 4.9.** *Hmgb1* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, (D) B16-F10 hücrelerinde *Hmgb1* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

*Hmgb1* gen ifade düzeyindeki değişim incelendiğinde, NIH/3T3 hücrelerinde kolşisin ile 10 saat boyunca muamele sonucunda  $1,6 \pm 0,06$  artış gösterirken, starvasyon sonrası kolşisin uygulandığında  $0,71 \pm 0,1$  azalma belirlendi. Vinorelbin uygulanan ve serum starvasyonu yapılan koşullarda ise azalma eğilimi görüldü. Starvasyon sonrasında vinorelbin uygulandığında ise belirgin bir azalma ( $3,77 \pm 2,45$  kat) belirlendi. NIH/3T3 hücreleri kolşisin veya vinorelbin ile 20 saat inkübe edildiğinde ise, *Hmgb1* mRNA düzeyinde artış eğilimi belirlendi (Şekil 4.9 A). *Hmgb1* gen ifade düzeyindeki değişim ise L929 hücrelerinde vinorelbin ile 10 saat ve 20 saat boyunca inkübasyon yapıldığında göz ardı edilebilir artışlar gösterdi. Kolşisin 10 saat veya 20 boyunca uygulandığında *Hmgb1* ifade düzeyinde azalma görülürken, serum starvasyonu ardından tam besiyeri içinde kolşisin ile 10 saate inkübasyon yapıldığında

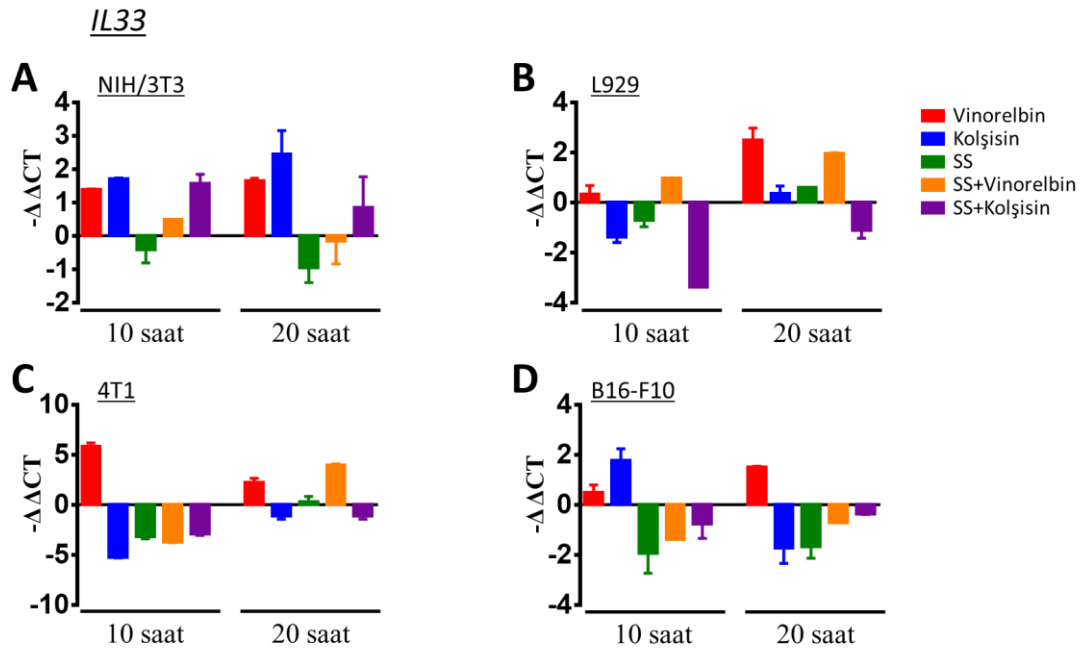
belirgin fark görülmedi. Kolşisinin 20 saat boyunca uygulandığı koşullarda ise azalış görüldü. 4T1 hücrelerinde ise, yalnızca hücreler 10 saat boyunca vinorelbin ile muamele edildiğinde ( $5,61\pm0,48$ ) ve serum starvasyonu ardından 20 saat boyunca vinorelbin ile inkübe ettiğinde ( $2,64\pm0,27$ ) artış görüldü. *Hmgbl* ifade düzeyindeki değişim 10 saat boyunca yapılan tüm inkübasyonlarda azalış gösterirken, 20 saat boyunca yapılan inkübasyonlarda anlamlı bir değişim göstermemekle beraber azalış eğilimi gösterdi. B16F10 hücrelerinde ise, vinorelbin ile inkübasyon yapıldığında ve serum starvasyonu sonrası kolşisin ile 20 saat boyunca inkübasyon yapıldığında sırasıyla  $2,04\pm1,04$  ve  $1,58\pm0,49$  artış belirlendi. Diğer tüm koşullarda minimal azalış görülürken 10 saat inkübasyon yapılan koşullarda belirgin düzeyde azalma izlendi (Şekil 4.9).



**Şekil 4.10.** *Nlrp3* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *Nlrp3* geni için qPCR yapıldı. *β-aktin* referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

Tüm hücre hatları için *Nlrp3* gen ifade düzeyindeki değişim incelendiğinde, kolşisin veya vinorelbin ile 10 saat boyunca muamele sonrasında azalış eğilimi görülürken, 20 saat boyunca muamele edildiğinde artış yönünde eğilim belirlendi. NIH/3T3 hücrelerindeki *Nlrp3* ifade düzeyi, 20 saat boyunca vinorelbin ile, muamele

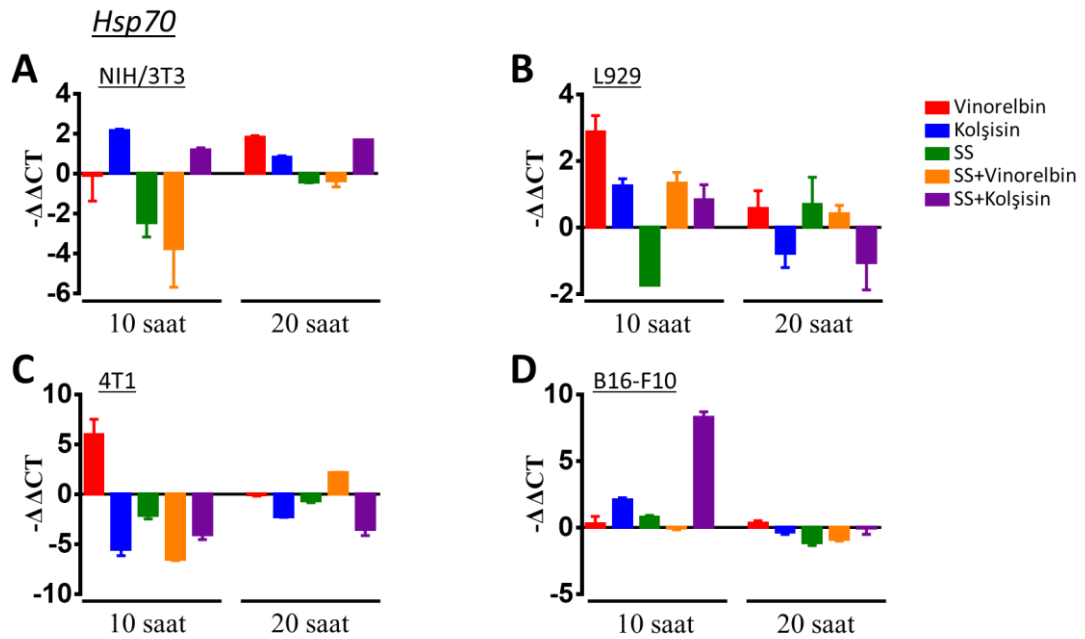
edildiğinde  $2,50\pm 0,56$  artış gösterdi. Diğer tüm koşullardaki tüm uygulamalarda minimal artış eğilimi belirlendi (Şekil 4.19). L929 hücrelerindeki *Nlrp3* ifade mRNA değişimine bakıldığında, genel olarak artış yönelimi görüldü. En fazla artış vinorelbin uygulandığında görüldü ve kolşisinle serum starvasyonu sonrasında 10 saat tam besiyerinde tutulan L929 hücrelerinde  $2,75\pm 0$  idi. Vinorelbin ve kolşisin 20 saat boyunca uygulandığında ekspresyon düzeyi sırasıyla  $3,05\pm 0$  ve  $2,75\pm 0$  artış gösterirken, serum starvasyonu sonrasında 20 saat boyunca vinorelbin ile muamele edildiğinde belirgin bir artış belirlenmedi (Şekil 4.10 B). 4T1 hücrelerindeki *Nlrp3* ifade düzeyi ise vinorelbinin etkisiyle artarken, diğer tüm koşullarda azalma yönünde eğilim gösterdi. Vinorelbin veya kolşisin ile inkübasyonun 10 saat olduğu hücrelerde yaklaşık 5 kat azalış belirlenirken, 20 saat süren inkübasyonların sonucunda anlamlı değişim görülmedi (Şekil 4.10 C). B16-F10 hücrelerindeki *Nlrp3* ifade düzeyi ise, serum starvasyonu ardından 10 saat kolşisin uygulamasıyla  $3,83\pm 0,73$  kat artarken, 20 saat boyunca vinorelbin ve kolşisinle inkübe edildiğinde artış eğilimi görüldü. Diğer tüm koşullarda ise ifade düzeyinde azalma belirlendi (Şekil 4.10 D).



**Şekil 4.11.** IL33 genine ait qPCR sonuçları. (A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde IL33 geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

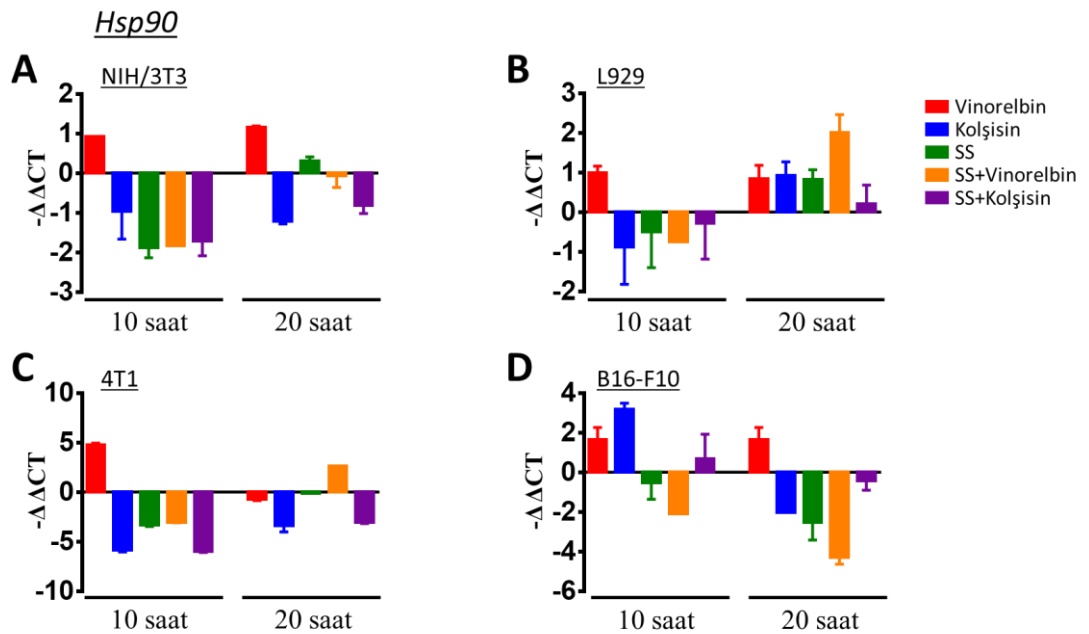
*IL33* geninin ifade düzeyine bakıldığında NIH/3T3 hücrelerine vinorelbin veya kolşisin uygulanan tüm koşullarda artış gösterdiği belirlendi. En belirgin artış 20 saat

boyunca kolşisin uygulanan hücrelerde,  $2,44 \pm 0,71$  olarak belirlendi (Şekil 4.11 A). L929 hücrelerinde ise kolşisin veya vinorelbin 10 saat boyunca uygulandığında gen ifade düzeyinde azalma eğilimi görülürken; 20 saat boyunca uygulandığında eğilimin artış yönünde olduğu belirlendi. L929 hücrelerinin *IL33* gen ifade düzeyinde kolşisin uygulaması sonucu azalış görülürken, vinorelbin uygulaması ile artış görüldü. En belirgin artış 20 saat vinorelbin ile muamele sonucu  $2,49 \pm 0,48$ , en belirgin azalış starvasyon ardından 10 saat boyunca kolşisin uygulanması sonucu  $3,37 \pm 0$  olarak belirlendi (Şekil 4.11 B). 4T1 hücrelerinde ise, yalnızca vinorelbinin etkisi ile *IL33* ifade düzeyinde artış görüldü. En belirgin artış 10 saat boyunca vinorelbin uygulanan hücrelerde görülürken, kolşisin uygulanan tüm 4T1 hücrelerinin gen ifade düzeyinde azalış belirlendi (Şekil 4.11 C). B16-F10 hücrelerinin *IL33* ekspresyon düzeyi yalnızca 10 saat ve 20 saat boyunca uygulanan vinorelbin ve 10 saat boyunca uygulanan kolşisin sonrasında artış gösterdi. En belirgin artış 10 saat boyunca kolşisin uygulaması sonrası  $1,77 \pm 0,47$  olarak kaydedildi. Bunun dışında uygulanan kolşisin ve vinorelbin inkübasyonları *IL33* gen ifadesinde azalmaya sebep oldu (Şekil 4.11 D).



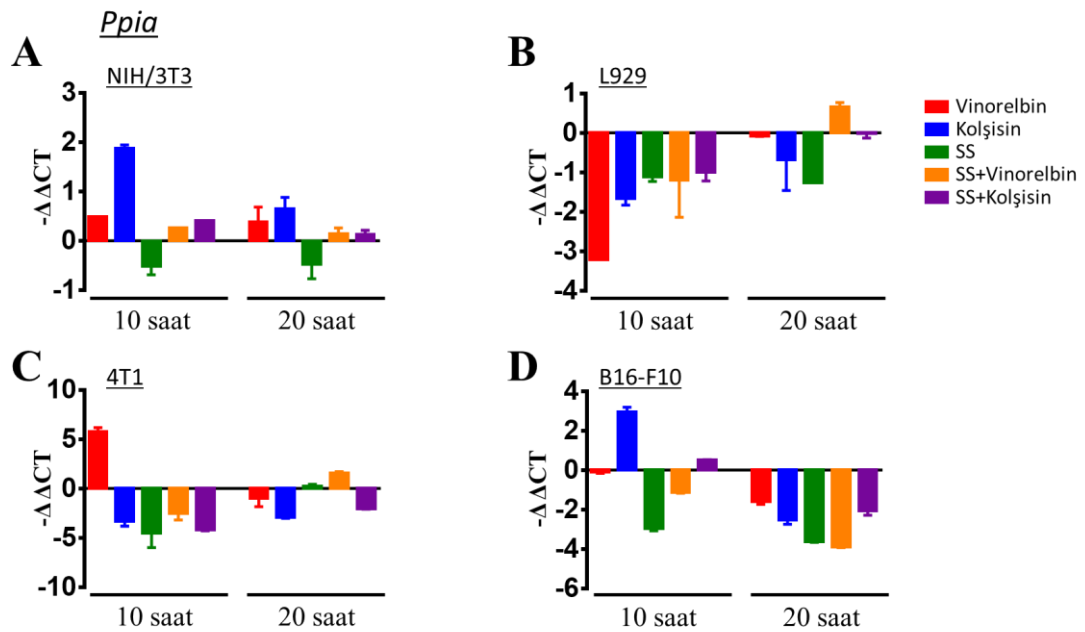
**Şekil 4.12.** *Hsp70* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, (D) B16-F10 hücrelerinde *Hsp70* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

Kolşisin ve vinorelbin etkisi ile *Hsp70* geninin ifade düzeyinde NIH/3T3 ve L929 hücrelerinde artış görülürken, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinde azalma yönünde eğilim vardı. NIH/3T3 hücrelerine kolşisin uygulanan tüm koşullarda *Hsp70* gen ifade düzeyinde artış izlenirken, vinorelbin ile yalnızca 20. saatte artış belirlendi. *Hsp70* mRNA düzeyindeki artışlar kontrole göre 2 kat olarak belirlenirken, en anlamlı azalma starvasyon sonrası 10 saat boyunca vinorelbin ( $3,74 \pm 1,95$ ) uygulaması ile görüldü (Şekil 4.12 A). L929 hücrelerinde ise 10 saat boyunca uygulanan hem vinorelbin hem de kolşisin etkisiyle *Hsp70* ekspresyon düzeyinde artış saptandı. Uygulama süresi 20 saate çıkarıldığında ise yalnızca vinorelbin varlığında artış görüldü. En belirgin artış vinorelbin ile 10 saat muamele sonrası  $2,87 \pm 0,35$  olarak belirlendi (Şekil 4.12B). 4T1 meme kanseri hücrelerinde vinorelbin ile 10 saat inkübasyonu *Hsp70* mRNA düzeyinde  $6,0 \pm 1,52$  ve starvasyon sonrası 20 saat vinorelbin uygulaması sonucunda ise  $2,18 \pm 0,02$  artış belirlendi. Diğer tüm koşullar *Hsp70* ifadesinde azalmaya sebep oldu (Şekil 4.12C). B16-F10 hücrelerinde ise, kolşisin ile 10 saat muamele sonucu *Hsp70* ifadesinde artış belirlenirken, kolşisin veya vinorelbin ile 20 saat inkübasyon *Hsp70* gen ifadesinde azalma ile sonuçlandı (Şekil 4.12D).



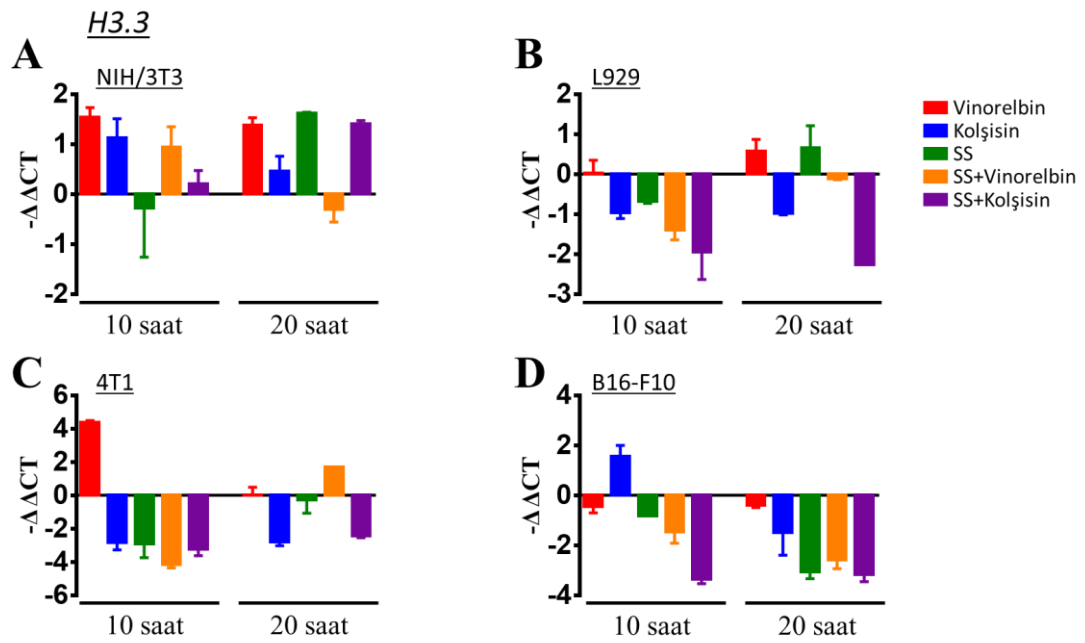
**Şekil 4.13.** *Hsp90* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1, (D) B16-F10 hücrelerinde *Hsp90* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

*Hsp90* gen ifadesi NIH/3T3 hücrelerinde sadece vinorelbin ile artış gösterirken, L929 hücrelerinde 20 saat boyunca uygulanan hem vinorelbin hem de kolşisin ile artış gösterdi. Öte yandan, 4T1 hücrelerinde 10 saat boyunca vinorelbin uygulaması ile ve starvasyon ardından 20 saat boyunca vinorelbin uygulaması ile *Hsp90* gen ifadesi arttı. B16-F10 hücrelerinde, 10 saat boyunca vinorelbin veya kolşisin uygulandığında *Hsp90* ifadesinde artış yönünde eğilim varken, 20 saat boyunca inkübasyon sonucu gen ifadesinde azalma görüldü. En belirgin artış 10 saat boyunca kolşisin uygulaması sonrası görülürken, hem 10 saat hem de 20 saat boyunca kolşisin muamelesi sonucunda yaklaşık 2 kat artış belirlendi (Şekil 4.13A-D).



**Şekil 4.14.** *Ppia* genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *Ppia* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -aktin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

Siklofilin A (*Ppia*) geninin ifade düzeyi, kolşisin veya vinorelbin varlığında, NIH3/T3 hücrelerinde artış gösterirken, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinde azalış gösterdi. NIH/3T3 hücrelerinde en belirgin artış kolşisin ile 10 saat ve 20 saat boyunca inkübasyon sonucunda belirlendi. Kolşisin ile 10 saat muamele sonucu  $1,88 \pm 0,06$  ve 20 saat muamele sonucu  $0,64 \pm 0,24$  artış belirlendi. 4T1 hücrelerinde 10 saat boyunca vinorelbin uygulamasıyla  $5,76 \pm 0,43$ , B16-F10 hücrelerinde kolşisin ile 10 saat inkübasyon sonucunda  $2,95 \pm 0,24$  artış yönünde değişim görüldü (Şekil 4.14 A-D).



**Şekil 4.15.** H3.3 (*H3f3a*) genine ait qPCR sonuçları. A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinde *H3f3a* geni için qPCR yapıldı.  $\beta$ -actin referans gen olarak kullanıldı. Kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı.

Histon 3.3 ifade düzeyi için NIH/3T3 hücrelerinde kolşisin ve vinorelbin varlığında artış görülürken, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinde azalış vardı. NIH/3T3 hücrelerinde kolşisin ve vinorelbin uygulanan tüm koşullarda yaklaşık 2 kat artış belirlendi. L929 hücrelerinde 20 saat boyunca vinorelbin ve starvasyon sonrası standart kültür ortamında 20 saat inkübasyon ile, 4T1 hücrelerinde 10 saat boyunca vinorelbin ile ve starvasyon sonrası 20 saat boyunca vinorelbin uygulanmasıyla ve B16-F10 hücrelerinde 10 saat boyunca kolşisin uygulaması sonucunda H3.3 ifadesinde artış gözlemlendi (Şekil 4.15 A-D).



**Tablo 4.1.** Kolşisin ve vinorelbin etkisi ile DAMP genlerinin ifadesinin artmış olduğu belirlenen koşullar. (K, kolşisin; V, vinorelbin; ss, serum starvasyonu; -  $\Delta\Delta CT \geq 1,5$ )

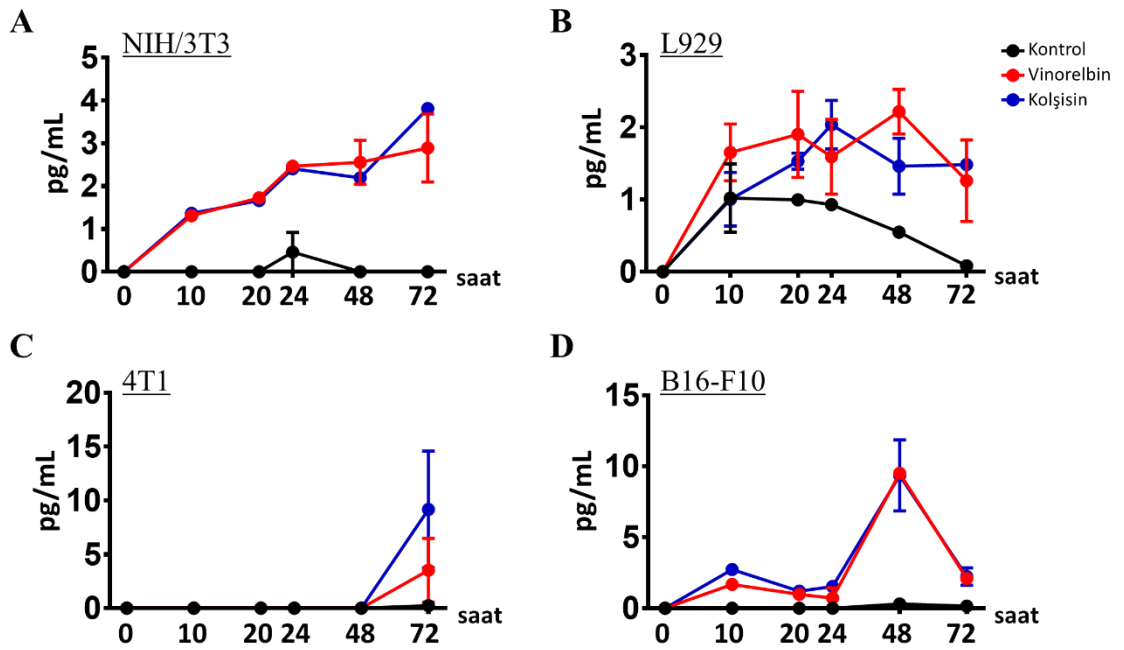
	NIH/3T3	L929	4T1	B16-F10
<i>Hmgb1</i>	K <sup>10sa</sup>	V <sup>20sa</sup>	V <sup>10sa</sup>	V <sup>20sa</sup>
<i>Nlrp3</i>	V <sup>20sa</sup>	V <sup>10,20sa</sup> , K <sup>20sa</sup> , ssV <sup>20sa</sup>	V <sup>10sa</sup> , ssV <sup>20sa</sup>	ssK <sup>10sa</sup>
<i>IL33</i>	K <sup>10sa</sup> , ssK <sup>10sa</sup> , V <sup>20sa</sup> , K <sup>20sa</sup>	V <sup>20sa</sup> , ssV <sup>20sa</sup>	V <sup>10sa</sup> , ssV <sup>20sa</sup>	K <sup>10sa</sup> , V <sup>20sa</sup>
<i>Hsp70</i>	K <sup>10sa</sup> , V <sup>20sa</sup> , ssK <sup>20sa</sup>	V <sup>10sa</sup>	V <sup>10sa</sup>	K <sup>10sa</sup> , ssK <sup>10sa</sup>
<i>Hsp90</i>	_____	ssV <sup>20sa</sup>	V <sup>10sa</sup>	V <sup>10sa</sup> , K <sup>10sa</sup> , V <sup>20sa</sup>
<i>Ppia</i>	K <sup>10sa</sup>	_____	V <sup>10sa</sup>	K <sup>10sa</sup>
<i>H3.3</i>	_____	_____	V <sup>10sa</sup>	K <sup>10sa</sup>

Genel olarak bakıldığında ~1,5 kat ve üzeri artış gösteren DAMP mRNA ifade düzeyleri, Vinorelbin uygulanan koşullarda kolşisine göre daha fazlaydı. 4T1 ve L929 hücrelerinin sadece vinorelbin varlığında DAMP genlerinin ifadesinde artış görülürken, NIH/3T3 ve B16-F10 hem vinorelbin hem de kolşisin varlığında mRNA ifadesinde artış gösterdi. *Hmgb1*, *Nlrp3*, *IL33* ve *Hsp70* mRNA düzeyi tüm hücrelerde artış gösterirken, *Hsp90* mRNA ifadesi NIH/3T3 hücrelerinde anlamlı bir artış göstermedi. Aynı şekilde *Ppia* mRNA düzeyi L929 hücrelerinde, *H3.3* mRNA düzeyi NIH/3T3 ve L929 hücrelerinde anlamlı bir artış göstermedi (Tablo 4.1).

#### 4.4 Vinorelbin ve Kolşisin DAMP Düzeylerine Etkisi

NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinden vinorelbin ve kolşisin etkisi ile hücre dışına salınan DNA miktarı vinorelbin veya kolşisin uygulaması sonrasında toplanan süpernatanlardan ölçüldü. Tüm hücrelerde vinorelbin ve kolşisin etkisiyle serbestlenen DNA miktarı zamana bağlı olarak artış eğilimi gösterdi. NIH/3T3 hücrelerinde kolşisin ve vinorelbin maruziyet süresi arttıkça, hücreden serbestlenen DNA doğru orantılı bir şekilde artış gösterdi (Şekil 4.16A). L929 hücrelerinde, kolşisin etkisi ile salınan DNA 24. saatten sonra azalmaya başlarken, vinorelbin etkisi ile 72. saatte

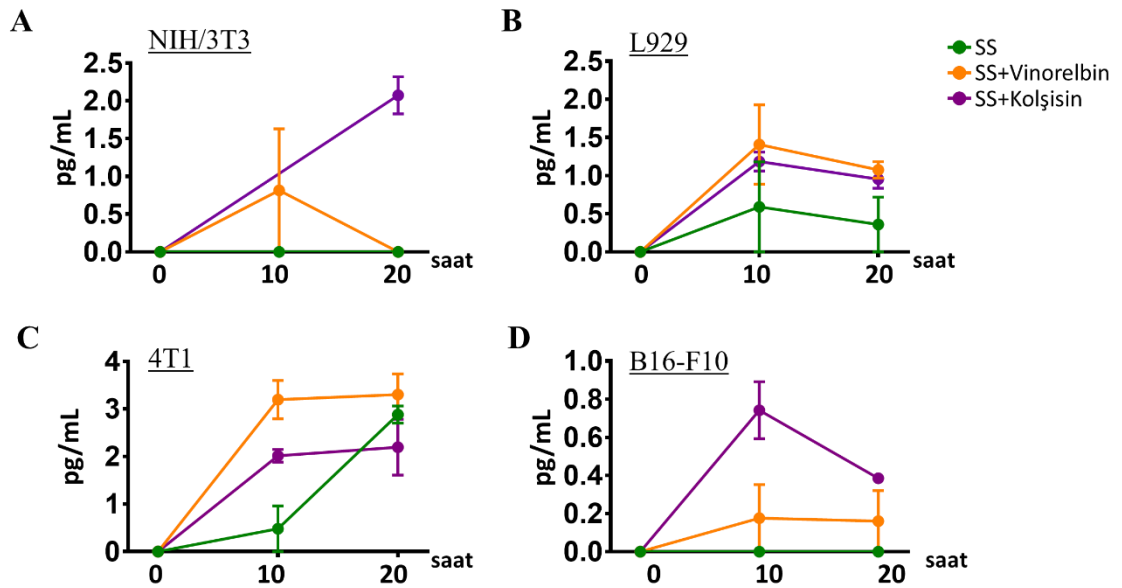
düşüş gösterdi. Beklenmedik bir şekilde L929 hücrelerinin kontrol koşullarında da DNA salınımı belirlendi ve zamana bağlı olarak azalış gösterdi (Şekil 4.16B). 4T1 hücrelerinde ise sadece 72. saatte hücre dışında DNA'ya rastlandı. Kolşisin etkisi ile serbestlenen DNA, vinorelbine nispeten daha fazlaydı (Şekil 4.16C). B16-F10 hücrelerinde ise, serbestlenen DNA ilk 24 saat boyunca minimal bir artış gösterirken 48. saatte ciddi bir artış gösterdi. Ancak inkübasyon devam ettiğinde 72. saatte yeniden azalma izlendi (Şekil 4.16D).



**Şekil 4.16.** A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinden kolşisin ve vinorelbine etkisi ile hücre dışına salınan DNA miktarı. Qubit dsDNA BR Assay Kiti kullanılarak belirlendi. Sonuçlar hücre sayısına göre normalize edildi. (n=3).

Hücreler serum starvasyonu ile senkron hale geldikten sonra kolşisin ve vinorelbine uygulandı. NIH/3T3 hücrelerinde inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak kolşisin varlığında hücre dışına salınan DNA miktarı arttı. Vinorelbine etkisiyle ise 10 saat maruziyet sonrası en fazla hücre dışı DNA miktarı ölçüldü, 20 saat maruziyet ile DNA belirlenemedi (Şekil 4.17A). L929 hücrelerinde ise en fazla hücre dışı DNA 10 saat boyunca maruziyet sonunda görüldü. İnkübasyon süresi uzatıldığında DNA miktarında anlamlı bir değişim görülmedi. Serum starvasyonu sonrasında vinorelbine veya kolşisin uygulanmadan hücreler tam kültür ortamında tutulduğunda da hücre dışı DNA miktarında artış görüldü. Yine de vinorelbine ve

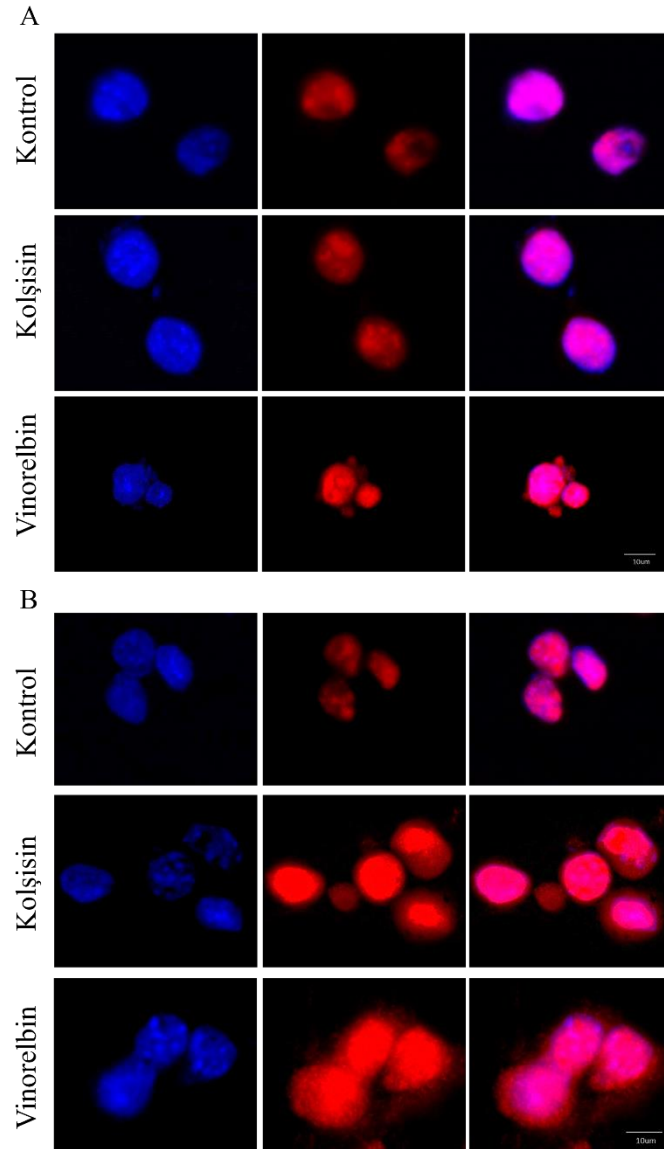
kolşisin varlığında olan artış daha fazla idi (Şekil 4.17B). 4T1 hücrelerinde standart kültür ortamında kolşisin ve vinorelbin ile maruziyeti sonucu ilk 20 saatte hücre dışı DNA belirlenemezken (Şekil 4.16C), serum starvasyonu ardından kolşisin veya vinorelbin uygulandığında hücre dışına salınan DNA miktarında artış görüldü. En belirgin artış 10 saat maruziyet sonrası görülürken, süre 20 saate uzatıldığında anlamlı bir değişim görülmedi. Serum starvasyonu sonrası ortam tam besiyeri ile değiştirildiğinde, artan inkübasyon süresi ile orantılı bir şekilde hücre dışı DNA miktarında artış belirlendi (Şekil 4.17C). B16-F10 hücrelerinde ise serum starvasyonu sonrası vinorelbin varlığında zamana bağlı olarak hücre dışı DNA miktarında artış görüldü. Kolşisin varlığında ise en belirgin artış 10 saat maruziyet sonrası görülürken, inkübasyon süresi 20 saate uzatıldığında DNA miktarında azalma görüldü. Hücre dışı DNA miktarının kolşisin varlığında vinorelbine göre daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.17D).



**Şekil 4.17.** A) NIH/3T3, (B) L929, (C) 4T1 ve (D) B16-F10 hücrelerinden serum starvasyonu sonrası vinorelbin ve kolşisin etkisi ile hücre dışına salınan DNA miktarı. Qubit dsDNA BR Assay Kiti kullanılarak belirlendi. Sonuçlar hücre sayısına göre normalize edildi. (SS, serum starvasyonu; n=3).

L929 ve B16-F10 hücrelerinde kolşisin veya vinorelbin etkisiyle Hmgb1 protein yerleşiminde değişim olup olmadığını belirleyebilmek için, hücreler 20 saat boyunca vinorelbin ve kolşisin ile inkübe edildi, ardından Hmgb1'in nükleustan

sitoplazmaya geçişi analiz edildi. Hücrelerde vinorelbin ve kolşisin inkübasyonu ardından çekirdekten dışarı Hmgb1 geçişi görülürken kontrol koşulunda Hmgb1'in çekirdek içinde lokalize olduğu belirlendi (şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** Hücrelerin HMGB1 sekresyonunun temsili görüntüsü. A) L929, (B) B16-F10 hücreleri 20 saat boyunca vinorelbin ve kolşisin ile inkübe edildikten sonra Hmgb1 antikoru ile floresan boyaması yapıldı. (Nükleus, mavi; Hmgb1, kırmızı). Ölçek çubuğu 10 µm'dir.

## 5.TARTIŞMA

Mikrotübüller hücre iskeletini oluşturan yapılardan biridir. Hücre büyümesi ve hareketi dışında temel hücresel olayları da düzenleyen önemli sinyal olaylarını da düzenlerler ve hücre stresi yanıtlarında rol oynarlar (91). Mikrotübüller dinamik bir yapıya sahiptir ve hücre döngüsünün tüm aşamalarında uzayıp kısalırlar. İnterfaz sırasında sentrozomda sabitlenir ve hücre çevresine doğru yayılırlar. Mikrotübülleri oluşturan tübülün dimerleri hücrede çözünür şekilde bulunur ve protein etkileşimleri ile birlikte mikrotübül davranışını düzenler (6). Hücresel faaliyetlerde bu kadar kritik rol oynayan mikrotübüller iyi bir kemoterapötik hedef teşkil eder. Anti-mitotik ajanlar mikrotübül stabilizasyonunu bozan veya stabile eden ajanlar olarak sınıflandırılır. Stabilizasyonu bozan ajanlar, mikrotübül polimerizasyonunu engeller. Mikrotübülleri stabilize eden ajanlar ise mikrotübül polimerizasyonunu artırır (92). Bu tez çalışmasında kullanılan vinorelbin ve kolşisin mikrotübül inhibitörleri olarak sınıflandırılan kemoterapötik ajanlardır (6). Bu bileşiklerin özellikle hücre döngüsünün mitotik fazında mikrotübüllere bağlandığı ve mikrotübül dinamiklerini bozduğu, bu sayede hücre çoğalmasını engellediği bilinmektedir (92).

Kolşisin, metafazdaki mitotik hücreleri bloke eder. Çözünür halde bulunan tübülünlere geri dönüşümlü bir şekilde tübülün-kolşisin kompleksleri oluşturmak üzere bağlanır. Bu kompleks de mikrotübül polimerlerinin uzamasını önlemek için mikrotübüllerin pozitif ucuna bağlanır (10). Kolşisinin bağlanmasıyla tübülünlerde meydana gelen konformasyonel değişiklikler, tübülün polimerizasyonu sırasında normal olarak oluşan konformasyonel değişikliklerden farklı olabilir (33). Tübülün-kolşisin kompleksinin mikrotübül uçlarına bağlanması ve uçlara ilave tübülün dimerlerinin eklenmesini sterik olarak engellemesi söz konusudur. Rai A. ve arkadaşları kolşisinin mitozu durdurduğunu ve MCF-7 hücrelerinde G2/M tutulmasını uyardığını gösterdiler (93). Biz de beklendiği gibi NIH/3T3, 4T1 ve B16-F10 hücrelerinde kolşisin etkisi ile G2/M fazında hücrelerin tutulduğunu gösterdik. G2/M fazındaki tutulma 20 saat boyunca yapılan inkübasyonlarda istatistiksel olarak daha anlamlıydı. Özellikle fibroblast hücreleri NIH/3T3 ve L929'da 10 saat kolşisin ile inkübasyon G2/M tutulması için yeterli olmadı. Ayrıca L929 hücrelerinde kolşisinin hücre döngüsüne etkisi görülmedi. Ancak, literatürde L929 hücreleri 5 uM kolşisin ile muamele edildiğinde G2/M fazında tutulma gösterilmiş. G2/M oranı %74 olarak

belirtilmiştir (94). Bu çalışmada ise subtoksik konsantrasyon kullanılması amaçlandığından dolayı, 25 nM kolşisin kullandığımızda G2/M tutulması görülmedi. L929 hücreleri için kolşisin konsantrasyonunun artırılmasının gerekli olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca,  $\alpha\beta$  tübülün heterodimerlerinden oluşan mikrotübüller, farklı hücre tiplerinde çeşitli yapısal ve fonksiyonel özellikler sergiler. Bu çeşitlilik, tübülün izotiplerinden ve bunların translasyon sonrasındaki modifikasyonlarından (*post translational modification*, PTM) kaynaklanır. Bu heterojenlikler mikrotübüllere farklı stabilite sağlar ve bazı kanser ilaçlarına karşı direnç gelişimine neden olabilir (95). Farklı hücrelerdeki bu heterojenliklerden dolayı L929 hücreleri kolşisine karşı direnç göstermiş olduğu düşünülebilir. Bu heterojenlikten dolayı farklı hücreler farklı miktarda mikrotübül içerebilir. L929 hücrelerindeki çözülmüş mikrotübül miktarı diğer hücrelerden fazla ise, kolşisin L929 hücreleri için yetersiz kalmış, tamamına bağlanamamış olabilir. Bunun dışında, fizyolojik koşullar altında kolşisinin p-glikoprotein (pgp) aracılı taşınması araştırılmıştır. Hücre içi kolşisin birikim kinetiğinin Pgp'nin yoğunluğuna bağlı olduğu ve hücre alımının önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (96). Bu durum, L929 veya Pgp'yi yüksek ifade eden (EMT6/AR1) gibi hücrelerde kolşisinin hücre içine alınımının engellenmesini ya da dışarı pompalanmasını sağlayarak mikrotübüllere etki etmesini önlemiş olabileceği düşünülmüştür.

Vinorelbinin bağlanma bölgesi, iki tübülün heterodimeri ( $\alpha 2$ - $\beta 1$ ) arasındaki arayüzde bulunur. Kolşisin çözümlü tübülün dimerlerine bağlanırken vinorelbin mikrotübül sonunda bulunan bağlanma bölgesine bağlanır. Vinka alkaloidlerin tubulin polimerizasyon dinamikleri üzerine etkileri konsantrasyonlarına bağlıdır. Özellikle düşük konsantrasyonlarda ( $\mu\text{M}$ 'ın altında), mikrotübüllerin uzayan (+) ucundaki heterodimerler ile etkileşim yoluyla doğrudan inhibisyonuna neden olur. Yüksek konsantrasyonlarda, tübülünleri spiraller ve parakristal agregatlar oluşturularak mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olacak farklı bir konformasyonda bağlanır (9). H1975 hücreleri 1, 10 ve 100 nM vinorelbin ile muamele edildiğinde sırasıyla %17,39, %34,31 ve %51,58 G2 faz oranı gösterilmiştir (97). Aynı şekilde 100 nM vinorelbin ile A498 ve 786-O hücrelerinde G2/M fazında tutulma gösterilmiştir (98). Literatürdeki bu örneklere bakıldığında biz de çalışmamızda vinorelbin ile hücrelerde kolşisine göre daha etkin bir G2/M fazında tutulma bekledik. Hem 10 saat

hem de 20 saat vinorelbin uygulaması sonucu tüm hücrelerin G2/M oranında artış görüldü.

Vinorelbin ve kolşisinin hücrelere etkisine bakıldığında vinorelbinin tüm koşullarda kolşisinden daha etkili olduğunu gördük. Vinorelbin mikrotübül sonlarına bağlanırken kolşisin çözünür haldeki tübülün dimerlerine bağlanır, bu yüzden vinorelbin ve kolşisin uygulandığı anda vinorelbin herhangi bir fazdaki hücreyi etkileyebilirken, kolşisinin etki gösterebilmesi için hücrenin M fazına geçiyor olması gerekir.

Normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde hücre bölünmesini düzenleyen, hücresel, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların incelenmesi, kanser araştırmalarının genel bir yaklaşımıdır. Bu sebeple, hücre çoğalmasının kontrolü için senkron edilmiş geniş popülasyonlar gereklidir. Hücre proliferasyonu normal hücrelerde sıkı bir şekilde düzenlenir; ancak, kanser hücrelerinde düzensizdir. Düzenleme, G1 fazından, DNA replikasyonunun başlamasından birkaç saat önce meydana gelir (99). Kültür edilmiş hücrelerde hücre döngüsü fazları serum starvasyonu, temas inhibisyonu ve kimyasal uygulamalarla senkron edilebilir. Serum starvasyonu, hücreleri G0/G1 fazında tutulmasını sağlayarak senkronizasyon için yaygın olarak kullanılır (100). Bu çalışmada hem fibroblast hem de kanser hücrelerinin hücre döngüsünü senkron edebilmek için serum starvasyonu uygulandı. Deri fibroblast hücrelerinde 24 saat boyunca serum starvasyonu yapan R.Khammanit ve ark. hücrelerin senkron olduğunu ve G0/G1 fazındaki hücre oranının %88,4±1,3 olduğunu gösterdiler. Serum starvasyonu sonrasında 24 saat tam besiyerinde hücreleri inkübe ettiklerinde ise G1, S ve G2/M fazındaki hücre oranlarının bölünmekte olan hücrelerle benzer oranlara geldiğini belirttiler (100). Tez çalışmamızda kullanılan NIH/3T3, L929, 4T1 ve B16-F10 hücreleriyle benzer şekilde 24 saat boyunca uygulanan serum starvasyonu ile döngü senkron hale getirildi. Serum starvasyonu ile hücreler sentez fazına geçemediğinden G1 fazında tutuldu. Beklenildiği üzere bu tutulma geçiciydi ve hücrelerin ortamı tam besiyeri ile değiştirildiğinde tekrar başlangıçtaki hale geldiler.

Starvasyon yapılan hücrelere kolşisin uygulandığında ise fibroblast hücrelerinde anlamlı bir etki göremezken, kanser hücrelerinde, özellikle 20 saat boyunca uygulandığında, G2/M oranında istatistiksel olarak anlamlı artış belirledik.

Kanser hücreleri fibroblastlara göre daha hızlı çoğaldığından hücreler G1 fazından G2/M fazına daha hızlı geçer ve kolşisin, G2/M fazında daha çok hücreye etki eder. Ancak, fibroblastların çoğalma hızı daha yavaş olduğundan G1'den G2/M fazına geçmiş hücre daha az olur ve mikrotübül polimerizasyonu daha az hücrede gerçekleşir; kolşisin fibroblastlar üzerindeki etkisini görebilmek için 20 saatin bu nedenle yeterli olmadığı söylenebilir. Starvasyon sonraki kolşisin uygulama süresi uzatıldığı takdirde fibroblast hücrelerinde de G2/M fazında tutulma görülebileceği şeklinde yorumlanabilir.

Starvasyon sonrası hücrelere vinorelbin uygulandığında ise, tüm hücrelerde, özellikle 20 saat boyunca muamele edildiğinde, G2/M fazında tutulma görüldü. Vinorelbinin etkisi mikrotübüllerin pozitif ucuna doğrudan etki ettiğinden yavaş çoğalan fibroblastlarda da G2/M tutulması görülmüştür.

Vinorelbinin (25 nM) 15 farklı hücrede 72 saat boyunca hücre miktarına etkisi incelendiğinde, her bir hücreye etkisi farklı oldu.  $\alpha\beta$  tübülün heterodimerlerinden oluşan mikrotübüller, farklı hücre tiplerinde çeşitli yapısal ve fonksiyonel özellikler sergiler. Bu da hücreler arası mikrotübüllerin heterojenliğini ve hücredeki mikrotübül miktarın çeşitliliğine olanak sağlar (95). Bu nedenle vinorelbinin hücreler üzerindeki etkisinin hücreden hücreye farklılık göstermiştir. EMT6/AR1, NIH/3T3 ve NCI-H441'in vinorelbinden daha az etkilenirken; B16-F10 ve hCMEC/D3 hücrelerinin daha duyarlı olduğu söylenebilir. hCMEC/D3 hücrelerinin primer hücre olması da bu durumu ortaya çıkarmış olabilir. Genel olarak hızlı çoğalan hücreler daha çok etkilenirken, yavaş çoğalan hücreler daha az etkilenmiştir. Vinorelbin konsantrasyonunun artırılması bu dengeyi değiştirebilir.

Kolşisin ve vinorelbinin mikrotübül polimerizasyonunu engellediğini gösterdikten sonra, hücrede oluşan bu stresin, stres ilişkili moleküler desen (DAMP) moleküllerinin gen ifadesindeki değişimine odaklanıldı. Hmgb1 normal koşullarda çekirdekte yerleşiktir ve kromatin yapısı ve gen ekspresyonu için önemli işlevleri vardır. Doku hasarı ile, modifiye edilmemiş Hmgb1 ölü hücrelerden dışarı sızar ve daha sonra kendiliğinden oksidasyonla ya da inflamatuvar hücreler tarafından üretilen ROS ile karşılaşarak disülfür-Hmgb1'e dönüştürülür. Hmgb1'in hücre dışına translokasyonu asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi post-translasyonel



değişikliklerle düzenlenir. Salgılanan HMGB1 asetile olduğu için pasif olarak salınan Hmgb1'den ayırt edilebilir (101, 102). HMGB1'in nekrotik veya apoptotik hücrelerden salındığı bilinmektedir (59). Çalışma kapsamında kullanılan kolşisin ve vinorelbin hücreler için sub-toksik konsantrasyonda uygulandı ve hücreler ölü olmamasına rağmen hem 10 saat hem de 20 saat inkübasyonun ardından hücrelerde hem gen ifadesinde artma yönünde eğilim görüldü, hem de immünfloresan boyamalar ile çekirdek dışındaki Hmgb1 gösterildi. Bu gözlem, hücre siklus blokajının yarattığı immün stres yönünde bilgi vermektedir.

NLRP3, steril inflamatuvar yanıtı başlatabilen hücre dışı ATP, hücre dışı DNA veya RNA gibi hücresel tehlike ilişkili moleküler desenlerle aktive edilir. Çoğu DAMP molekülü doku hasarından sonra hücre dışına salınır. Bu moleküller hücre yüzeyinde tanındığında hücre içi NLR ailesi aracılığı ile inflamazom aktivasyonuna yol açar (103, 104). Vinorelbin etkisi ile hücrelerden salınan DAMP molekülleri, hücrelerin çoğunda, özellikle 20 saat inkübasyon sonrasında, *Nlrp3* gen ifadesinin artışı uyarmıştır. Kolşisin kaspaz-1 aktivasyonundan ve ardından IL-1 $\beta$  ve IL-18 işlenmesi ve salınımından sorumlu (NLRP3) inflamazom oluşumunu baskılar (10). Bu sebepten kolşisin ile muamele edilen hücrelerin *Nlrp3* mRNA düzeyinde artış görülmemiş olabilir. Beklendiği üzere, kolşisin L929 hücrelerine etki etmediğinden *Nlrp3* ekspresyonu etkilenmemiştir.

IL-33, çoğunlukla endotel hücreler fibroblastlar ve dış çevre ile temas eden dokuların epitel hücreleri gibi stromal hücrelerde eksprese edilen bir alarmandır. IL-33, N-terminal ucunda bulunan bir sinyal sayesinde çekirdeğe yerleşir. Nükleer konumu ve hücre bütünlüğünün kaybı üzerine salınması nedeniyle IL-33'ün HMGB1 ve IL-1 ile uyumlu, çift fonksiyonlu alarmin olduğu öne sürülmüştür (101, 105). Kolşisin ve vinorelbin uygulaması sonucu hücrede stres oluştuğundan ve mikrotübül yapısı bozulduğunda hücrelerde tehlike ilişkili protein IL33'ün gen ifadesinde artış belirlendi. *IL33*'ün normal koşullarda da fibroblastlarda ekspresyonu daha fazla olduğundan, mikrotübül inhibitörlerinin etkisiyle fibroblast hücreleri NIH/3T3 ve L929'da gen ifadesinde artış daha fazla olarak belirlendi.

Tüm organizmalarda, çok çeşitli uyaranların neden olduğu ısı şoku yanıtı, moleküler şaperonlar olarak işlev gören ve stres altındaki hücreler için ısı şoku

proteinleri (HSP) olarak adlandırılan protein ailesinin ekspresyonunu artırır. Stres proteinleri esas olarak hücre içi şaperonlar özelinde incelenmiş ve hücrelerden salımının tipik olarak lizizden sonra meydana geldiği söylenmiştir. Ancak, günümüzde sadece ciddi hasarlardan sonra değil, hücreler tamamen canlı olsa bile çeşitli hücre tiplerinden salgılanabildiği bilinmektedir (106). Mikrotübül inhibitör ajanlarının DAMP'ları indüklediği ve 2,5 uM kolşisin, doksorubisin gibi ajanlar ile *Hsp70*, *Hsp90* ve *Hmgbl* ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (35). Çalışmamızda 25 nM konsantrasyonda kolşisin veya vinorelbin uyguladığımızda hücrelerin çoğunda hem *Hsp70* hem de *Hsp90* ifadesinde artış belirledik. Kolşisin vinorelbine göre daha az hücrede HSP ekspresyonunu uyardı. Kolşisin konsantrasyonunun artırılması ile HSP ekspresyonu uyarılabileceği düşünülmüştür.

Siklofilin A geninin (*Ppia*) normal ve stres koşulları altında eksprese edildiği bilinmektedir. Birçok klinik çalışmada, romatoid artrit hastalarının sinovial sıvılarında ve kanser hastalarının periferik kanında yüksek düzeyde hücre dışı PPIA belirtilmiştir (107, 108). Çalışmada kullanılan kolşisin ve vinorelbinin hücrelerde stres durumu oluşturduğundan, *Ppia* mRNA ifadesinde artışlar görüldü. En fazla strese uğrayan hücre NIH/3T3 iken, L929 *Ppia* ifadesinde değişimi uyaraacak strese uğramadı.

Histon proteinlerinin nükleer fonksiyona ek olarak, çekirdekten hücre dışı boşluğa geçtiklerinde endojen tehlike sinyalleri veya DAMP'lar olarak işlev gördükleri gösterilmiştir (109). H2A, H2B, H3, H4 ve H1, strese tepki olarak, bağışıklık hücrelerinin, serebellar nöronların, Schwann hücrelerinin ve mikrogliaların hücre yüzeyinde veya sitoplazmasında bulunabilir. Dolaşımdaki histonların yanı sıra nükleozom seviyeleri kanser veya enfeksiyonu olan hastalarda artar (74). Yapılan bir çalışmada 2 uM kolşisinin dermal pailla hücrelerinde Histon 4 (H4) mRNA düzeyini değiştirmediği gösterilmiş (110). Ancak, çalışmamızda kolşisin ve vinorelbinin etkisi ile 4T1 ve B16-F10 hücrelerinde *H3.3* mRNA düzeyinin arttığı tespit edildi.

Nükleik asitler genellikle hücre nekrozu ve nükleer yıkımdan sonra dolaşıma geçer. Hücre dışındaki bu DNA molekülleri DAMP görevi görebilir. Genellikle hücre nekrozu ve nükleer yıkımlar ile nükleik asitler hücre dışına serbestlenir (76). Yüksek doz kemoterapi tedavisi hızlı nekrotik hücre ölümüne ve DNA'nın salınmasına neden olur. HCT116 hücreleri 48 saat melfalan (10 uM ve 100 uM) ve oksaliplatin (10 uM

ve 100 uM) ile muamele edildiğinde, artan kemoterapötik konsantrasyonları ile süpernatanda artan DNA miktarı belirtildi (111). Çalışmamızda daha düşük konsantrasyonlarda mikrotübül inhibitörleri kullandığımızda, hücreler nekrotik olmamasına rağmen zamana göre artan miktarlarda DNA serbestlediğini gösterilebilmiştir. B16-F10 hücrelerinde kolşisin ve vinorelbin inkübasyonu 72. Saate ulaştığında hücre dışına salınan DNA miktarında azalma görüldü. Bu durumun, ajanların tersinir olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. 4T1 hücrelerinde ise ilk 20 saatte vinorelbin ve kolşisin varlığında hücre dışı DNA'ya rastlanmazken, serum starvasyonu sonrası ajanlarla inkübasyon 20 saate uzatıldığında hücre dışı DNA miktarında artış gözlemlendi. Bu artış serum starvasyonunun hücrede yarattığı stresten kaynaklandığı düşünülebilir.

Kolşisin ve vinorelbinin hücrede oluşturduğu stres ile DAMP moleküllerinin mRNA seviyesinde artış gösterilmesi, DAMP moleküllerinin protein düzeyinde değiştiğine ve hücre dışına salındığının kanıtı değildir. Ancak, bu genlerinin ifade düzeylerinin artışı ile moleküllerin hücre dışına salınacağı speküle edilebilir. Ayrıca, Hmgb1'in hücre çekirdeğinin dışına çıktığı immünfloresan boyamalar ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak, mikrotübül inhibitörleri vinorelbin ve kolşisinin mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek hücrelerin G2/M fazında tutulmasını destekler. Hücre döngüsü blokajının hücrede oluşturduğu stres ile DAMP moleküllerinin ekspresyonunu artış yönünde düzenlenebilir. Buna dayanılarak, artan stres moleküllerinin inflamatuvar uyarılar olarak kanserdeki immünolojik durumu nasıl etkileyebileceğine dair analizler yapılabilir. Kolşisin ve vinorelbin ile DAMP artışının kanserdeki inflamasyonu nasıl düzenlediği, olası immünoterapi yaklaşımlarına etkisi araştırılabilir. Çalışmada kullanılan vinorelbin ve kolşisinin konsantrasyonu subtoksik olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda hücrelerin ölmediği, ancak proliferasyonlarının durduğunu düşünmekteyiz. Bu konsantrasyonda da hücrede mikrotübül polimerizasyonunun engellenmesi ve DAMP artışının görülmesi, kemoterapötiklerin daha düşük konsantrasyonlarda immünoterapiye destek olarak kullanılabilmesine dair araştırmaların önünü açabilecektir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Vinorelbin ve kolşisin NIH/3T3 fibroblast hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanarak sub-toksik doz 25 nM olarak belirlendi.
- Vinorelbin ve kolşisin, hem standart kültür ortamında tutulan hem de serum starvasyonu uygulanan hücrelere 20 saat boyunca uygulanarak hücre miktarına etkisi incelendi. Tüm hücrelerde canlı hücre miktarının %85'in altına düşmediği gösterildi.
- Hücreler 20 saat boyunca standart kültür ortamında tutulduğunda hücre döngüsü fazlarında herhangi bir değişim belirlenmedi. Ancak hücrelere 24 saat boyunca serum starvasyonu uygulandığında tüm hücrelerin G1 fazındaki hücre oranında anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0,05$ ).
- Serum starvasyonuna maruz kalan hücrelerin çoğalmaya devam etmesini sağlamak amacıyla, ortam tam besiyeri ile değiştirilip 20 saat boyunca inkübe edildiğinde, hücre döngüsü fazlarının başlangıçtaki oranlara döndüğü belirlendi.
- Hücrelere kolşisin uygulandığında hem 10 saat hem de 20 saat boyunca inkübasyon sonrası G2/M fazındaki hücre oranında artış belirlendi. Ancak, serum starvasyonu sonrasında kolşisin uygulandığında, yalnızca 20 saat boyunca inkübasyon ile G2'de artış görüldü. L929 hücrelerinde ise herhangi bir değişim görülmedi. Kolşisinin konsantrasyonu artırılarak ancak yine subtoksik konsantrasyonu aşmamak kaydıyla L929 hücrelerinde canlı hücre miktarı analiz edilebilir ve daha yüksek konsantrasyonda kolşisin ile hücre döngüsü analizi yapılabilir.
- Hızlı bölünen kanser hücrelerinde kolşisinin etkisi daha fazla görülürken, fibroblast hücreleri yavaş bölündüğünden kolşisinin etkisi nispeten daha az görüldü.
- Hücrelere vinorelbin uygulandığında da kolşisin ile benzer şekilde hem 10 saat hem de 20 saat boyunca inkübasyon ile G2/M fazında tutulma görüldü. Serum starvasyonu sonrasında ise, yalnızca 20 saat boyunca vinorelbin uygulandığında G2/M oranında artış belirlendi.

- Genel olarak, vinorelbinin hücre döngüsünü bloklama etkisinin kolşisininden fazla olduğu görüldü. Sinerjik etkinin incelenebilmesi için kolşisin ve vinorelbin birlikte hücrelere uygulanabilir.
- G2/M oranında hem kolşisin hem de vinorelbin etkisiyle zamana bağlı artış belirlendi. Tüm hücrelerde inkübasyon süresi uzatılarak hücre döngüsü fazları analiz edilebilir.
- Kolşisin ve vinorelbinin mikrotübül polimerizasyonunu bozduğu immün floresan boyamalarla gösterildi.
- Kolşisin ve vinorelbinin 7 farklı DAMP molekülünün mRNA ifade düzeyini değiştirdiği gösterildi. Aynı zamanda hücre dışına serbestlenen DNA miktarının zamana bağlı olarak arttığı gösterildi. Bunlara ek olarak nükleus dışına çıkan HMGB1 immünfloresan boyamalar ile gösterildi. İlerde yapılacak DAMP moleküllerinin de hücre dışına salımları immünfloresan boyamalar veya süpernatandan ELISA analizleri ile gösterilebilir.
- Kolşisin ve vinorelbin etkisi ile salınan DAMP moleküllerinin fonksiyonlarının araştırılması için, ajanların uygulandığı hücrelerden toplanan süpernatantlar ile fare makrofaj hücreleri ile kültür edilerek makrofajların ROS/NO üretim kapasiteleri, fagositoz kapasiteleri ve canlılıkları incelenebilir, immün fenotip analizleri yapılabilir. Böylece hücrelerin faz blokajı sonrasında ortaya çıkan stres moleküllerinin inflamatuvar uyaran olduğuna dair fonksiyonel analizler yapılabilir.
- Ayrıca hangi desen tanıma reseptörü üzerinden sinyal ilettiğini incelemek için TLR4 ve TLR9 gibi en yaygın DAMP moleküllerini tanıyan reseptörlerin antagonistleri ile deney tasarımları yapılabilir.
- *In vitro* olarak tamamladığımız çalışma *in vivo* koşullarda da devam ettirilebilir. Farelere 4T1 meme kanseri veya B16-F10 melanom hücreleri enjekte edilerek tümör oluşumu sağlandıktan sonra kolşisin veya vinorelbin uygulanabilir. Ajanların etkisi ile tümör çevresindeki serbestlenen DAMP molekülleri ve inflamasyona etkileri araştırılabilir.

## 7.KAYNAKLAR

1. Baudino TA. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol.* 2015;12(1):3-20.
2. Espinosa E, Zamora P, Feliu J, Gonzalez Baron M. Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(6):515-23.
3. Puyo S, Montaudon D, Pourquier P. From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89(1):43-61.
4. Peng M, Darko KO, Tao T, Huang Y, Su Q, He C, et al. Combination of metformin with chemotherapeutic drugs via different molecular mechanisms. *Cancer Treat Rev.* 2017;54:24-33.
5. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(10):789-802.
6. Schmidt M, Bastians H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updat.* 2007;10(4-5):162-81.
7. Cooper GM. *The cell: a molecular approach* 2nd Edition. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf; 2000.
8. Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2018;28(10):776-92.
9. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;28(17):2816-26.
10. Leung YY, Hui LLY, Kraus VB, editors. Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Seminars in arthritis and rheumatism*; 2015: Elsevier.
11. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev.* 2015;24(Pt A):29-39.
12. Larionova I, Cherdyntseva N, Liu T, Patysheva M, Rakina M, Kzhyshkowska J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology.* 2019;8(7):1596004.
13. Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(2):104-20.

14. Bignold LP. Alkylating agents and DNA polymerases. *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1327-36.
15. Giraud B, Hebert G, Deroussent A, Veal GJ, Vassal G, Paci A. Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(8):919-38.
16. Peters GJ. Novel developments in the use of antimetabolites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):358-74.
17. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8.
18. Casciato DA, Lowitz BB. Cancer chemotherapeutic agents. *Manual of clinical oncology*, 6th edn Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2009:46-99.
19. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):188-200.
20. Vardanyan RS, Hruby VJ. *Synthesis of best-seller drugs.* Amsterdam: Elsevier/AP; 2016. xxii, 846 pages p.
21. O'Connor CM, Adams JU, Fairman J. *Essentials of cell biology.* Cambridge, MA: NPG Education. 2010;1:54.
22. Olziersky AM, Labidi-Galy SI. Clinical Development of Anti-mitotic Drugs in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1002:125-52.
23. Florian S, Mitchison TJ. Anti-Microtubule Drugs. *Methods Mol Biol.* 2016;1413:403-21.
24. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(20):9552-6.
25. Krause W. Resistance to anti-tubulin agents: From vinca alkaloids to epothilones. *Cancer Drug Resist.* 2019;2:82-106.
26. Campos SM, Dizon DS. Antimitotic inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2012;26(3):607-28, viii-ix.
27. Zhang Y, Yang SH, Guo XL. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2017;96:659-66.

28. Drummond DC, Noble CO, Guo Z, Hayes ME, Park JW, Ou CJ, et al. Improved pharmacokinetics and efficacy of a highly stable nanoliposomal vinorelbine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328(1):321-30.
29. Capasso A. Vinorelbine in cancer therapy. *Curr Drug Targets.* 2012;13(8):1065-71.
30. Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res.* 1991;51(8):2212-22.
31. Ben-Chetrit E. Colchicine. *Textbook of Autoinflammation: Springer; 2019.* p. 729-49.
32. Ben-Chetrit E, Bergmann S, Sood R. Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology.* 2006;45(3):274-82.
33. Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal research reviews.* 2008;28(1):155-83.
34. Phelps P. Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. IV. Colchicine inhibition of chemotactic activity formation after phagocytosis of urate crystals. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* 1970;13(1):1-9.
35. Wen C-C, Chen H-M, Chen S-S, Huang L-T, Chang W-T, Wei W-C, et al. Specific microtubule-depolymerizing agents augment efficacy of dendritic cell-based cancer vaccines. *Journal of biomedical science.* 2011;18(1):44.
36. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018;9(6):7204-18.
37. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):826-37.
38. Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of sterile inflammation. *J Immunol.* 2013;191(6):2857-63.
39. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(12):a016287.
40. Kono H, Onda A, Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2014;26:147-56.



41. Rubartelli A, Lotze M, Latz E, Manfredi A. Mechanisms of Sterile Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2013;4(398).
42. Pradeu T, Cooper EL. The danger theory: 20 years later. *Front Immunol*. 2012;3:287.
43. Erridge C. The roles of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18(2):52-6.
44. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1-13.
45. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):158-75.
46. Raymond SL, Holden DC, Mira JC, Stortz JA, Loftus TJ, Mohr AM, et al. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(10 Pt B):2564-73.
47. Rajaei A, Barnett R, Cheadle WG. Pathogen- and Danger-Associated Molecular Patterns and the Cytokine Response in Sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2018;19(2):107-16.
48. Awasthi S. Toll-like receptor-4 modulation for cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2014;5:328.
49. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45:e66.
50. Dziarski R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2003;60(9):1793-804.
51. Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*. 2003;20(5):402-14.
52. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 2018;18(4):e27.
53. Venereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol*. 2015;6:422.
54. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014;289(51):35237-45.

55. Das N, Dewan V, Grace PM, Gunn RJ, Tamura R, Tzarum N, et al. HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia. *Cell Rep.* 2016;17(4):1128-40.
56. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* 2008;214(2):161-78.
57. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(12):860-75.
58. Muller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med.* 2004;255(3):332-43.
59. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:367-88.
60. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003;101(7):2652-60.
61. Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):209.
62. Huang J, Xie Y, Sun X, Zeh HJ, 3rd, Kang R, Lotze MT, et al. DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. *Ageing Res Rev.* 2015;24(Pt A):3-16.
63. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 1995;269(5230):1585-8.
64. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Jr., Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3689-94.
65. Deka K, Saha S. Regulation of Mammalian HSP70 Expression and Stress Response. In: Asea AAA, Kaur P, editors. *Regulation of Heat Shock Protein Responses.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 3-25.
66. Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2013;94(6):1167-84.

67. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):185-94.
68. Ding XZ, Fernandez-Prada CM, Bhattacharjee AK, Hoover DL. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. *Cytokine.* 2001;16(6):210-9.
69. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in biochemical sciences.* 2008;33(2):71-9.
70. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3(7):382-90.
71. Magna M, Pisetsky DS. The Alarmin Properties of DNA and DNA-associated Nuclear Proteins. *Clin Ther.* 2016;38(5):1029-41.
72. Huang H, Chen HW, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, et al. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol.* 2013;191(5):2665-79.
73. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis.* 2017;8(5):e2812.
74. Chen R, Kang R, Fan XG, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1370.
75. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, et al. *Molecular biology of the cell.* new york: Garland science; 2002. Classic textbook now in its 5th Edition. 2002.
76. Relja B, Land WG. Damage-associated molecular patterns in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2019.
77. Zhang Q, Kang R, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Tang D. DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death. *Autophagy.* 2013;9(4):451-8.
78. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:168.
79. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-44.
80. Patidar A, Selvaraj S, Sarode A, Chauhan P, Chattopadhyay D, Saha B. DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor. *Cytokine.* 2018;104:114-23.

81. Radogna F, Diederich M. Stress-induced cellular responses in immunogenic cell death: Implications for cancer immunotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2018;153:12-23.
82. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene.* 2016;35(46):5931-41.
83. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother.* 2010;33(4):335-51.
84. Krysko O, Love Aaes T, Bachert C, Vandenabeele P, Krysko DV. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2013;4:e631.
85. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Hasko G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(12):842-57.
86. Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN, editors. *Interleukin-1 $\alpha$ . Seminars in immunology*; 2013: Elsevier.
87. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Front Immunol.* 2017;8:1908.
88. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):28-37.
89. Jaattela M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer.* 1995;60(5):689-93.
90. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis.* 2013;34(6):1181-8.
91. Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front Oncol.* 2014;4:153.
92. Gigant B, Cormier A, Dorleans A, Ravelli RB, Knossow M. Microtubule-destabilizing agents: structural and mechanistic insights from the interaction of colchicine and vinblastine with tubulin. *Top Curr Chem.* 2009;286:259-78.
93. Rai A, Kapoor S, Naaz A, Kumar Santra M, Panda D. Enhanced stability of microtubules contributes in the development of colchicine resistance in MCF-7 cells. *Biochem Pharmacol.* 2017;132:38-47.

94. Sazanova ES, Gracheva IA, Allegro D, Barbier P, Combes S, Svirshchevskaya EV, et al. Alcolchicinoids bearing a Michael acceptor fragment for possible irreversible binding of tubulin. *RSC Medicinal Chemistry*. 2020.
95. Prassanawar SS, Panda D. Tubulin heterogeneity regulates functions and dynamics of microtubules and plays a role in the development of drug resistance in cancer. *Biochem J*. 2019;476(9):1359-76.
96. Decleves X, Niel E, Debray M, Scherrmann JM. Is P-glycoprotein (ABCB1) a phase 0 or a phase 3 colchicine transporter depending on colchicine exposure conditions? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;217(2):153-60.
97. Liu H, Fu Q, Lu Y, Zhang W, Yu P, Liu Z, et al. Anti-tubulin agent vinorelbine inhibits metastasis of cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Eur J Med Chem*. 2020;200:112332.
98. Sinha S, Cao Y, Dutta S, Wang E, Mukhopadhyay D. VEGF neutralizing antibody increases the therapeutic efficacy of vinorelbine for renal cell carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2010;14(3):647-58.
99. Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*. 1991;51(13):3602-9.
100. Khammanit R, Chantakru S, Kitiyanant Y, Saikhun J. Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriogenology*. 2008;70(1):27-34.
101. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(1):43-64.
102. Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol Rev*. 2017;280(1):74-82.
103. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(2):148-59.
104. Shimizu H, Sakimoto T, Yamagami S. Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation. *Sci Rep*. 2019;9(1):9596.

105. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? PLoS One. 2008;3(10):e3331.
106. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. Trends Biochem Sci. 2008;33(2):71-9.
107. Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P. Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. J Exp Med. 1997;185(5):975-80.
108. Ralhan R, Masui O, Desouza LV, Matta A, Macha M, Siu KW. Identification of proteins secreted by head and neck cancer cell lines using LC-MS/MS: Strategy for discovery of candidate serological biomarkers. Proteomics. 2011;11(12):2363-76.
109. Watson K, Edwards RJ, Shaunak S, Parmelee DC, Sarraf C, Gooderham NJ, et al. Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells. Biochem Pharmacol. 1995;50(3):299-309.
110. Hsia CW, Shui HA, Wang CY, Yu HM, Ho MY, Cheng KT, et al. Proteomics demonstration that histone H4 is a colchicine-induced retro-modulator of growth and alkaline phosphatase activity in hair follicle dermal papilla culture. J Proteomics. 2011;74(6):805-16.
111. Anunobi R, Boone BA, Cheh N, Tang D, Kang R, Loux T, et al. Extracellular DNA promotes colorectal tumor cell survival after cytotoxic chemotherapy. J Surg Res. 2018;226:181-91.